

導波モード共鳴効果およびスマートフォン技術を集積した
携帯型医療診断プラットフォームの構築

雪野 瞭治

電気通信大学 大学院情報理工学研究科

博士(工学)学位申請論文

2019 年 3 月

導波モード共鳴効果およびスマートフォン技術を集積した
携帯型医療診断プラットフォームの構築

博士論文審査委員会

Sandhu Adarsh	教授	(基盤理工学専攻)(主査)
一色 秀夫	教授	(基盤理工学専攻)
奥野 剛史	教授	(基盤理工学専攻)
瀧 真清	准教授	(基盤理工学専攻)
渡邊 恵理子	准教授	(基盤理工学専攻)
栞原 正靖	教授	(日本大学 文理学部)

著作権所有者

雪野 瞭治

2019

Point of care medical diagnostics platform based on integrating Guided Mode Resonance effect and smartphone technology

Specifically outlining the research in this doctoral thesis, the work is organized as follows:

Chapter 1. Abstract, purpose of the research, and flow chart of the thesis.

Chapter 2. Introduction the includes descriptions of biological materials, such as proteins and antibodies, and a selection of detection methods using biosensors.

Chapter 3. Overview of Guided Mode Resonance (GMR) filters with a historical overview, theory and applications such as color filter and sensing applications.

Chapter 4. Methods used to fabricate the one dimensional (1D) tunable GMR filters used in this research. I also describe wavelength tuning in a 1D silicon nitride nano-grating GMR structure under conical mounting configuration of the device and present a theoretical model to explain the resonance conditions observed in the experiments and predict the peak positions which show excellent agreement with experiments.

Chapter 5. I have investigated the properties of the GMR filter as a refractive index sensor. In order to experimentally test the feasibility of using the filter as a sensor, I measured samples of four different concentrations of aqueous salt solution. After that, I demonstrated a biosensing protocol based on monitoring the changes of peak positions using avidin-biotin interaction.

Chapter 6. I describe the detection of biomolecules by combining the GMR filter with a smartphone spectroscope. I demonstrate that the system clearly detects changes in the concentration of avidin concentration using an iPhone spectrometer.

Chapter 7. I propose a new method to improve the sensitivity of GMR filters by using magnetic nanoparticles (MNPs). Using avidin-biotin model experiments, I demonstrate that attaching MNPs to sensor surfaces enhanced the dynamic range of detection of the GMR system. The shift in PWV position was clearly enhanced by the MNPs. These results show that the enhancement of sensitivity of GMR detection was achieved by using MNPs.

Chapter 8 summarizes each chapter and concludes this doctoral dissertation, and proposes future research.

概要

本論文は携帯型の装置での分析を前提とした検体の定量検出が可能であるバイオセンシング手法の開発を目的として、(1)蛍光標識を必要とせずに生体物質の定量検出を行う事が可能なバイオセンサの開発、(2)スマートフォン上でセンサからの信号を分析するための分光測定システムの開発、(3)磁性粒子を用いた高感度検出手法の実現についてそれぞれ取り組み、携帯型の定量分析装置開発における指針について報告する。

本論文は 8 章から構成されている。

第 1 章では、研究の背景・目的・論文の構成についてそれぞれ述べている。

第 2 章ではウイルスや病原菌、特定など特定の物質を検出するために必要となる抗体抗原反応やタンパク質の相互作用について述べた。加えて、医療診断技術を行ううえで欠かせない要素であるバイオセンサの原理について述べた。

第 3 章では本研究でセンシング原理として着目した導波モード共鳴効果(**Guided Mode Resonance : GMR**)について歴史概観からその応用事例について述べるとともに、携帯型医療診断システムにおける本手法の有用性について述べる。注意点として、本論文で扱う略称としての **GMR** は、巨大磁気抵抗効果 (**Giant Magneto Resistive effect**) と異なる事に留意する必要がある。第 2 章で医療診断を行うための検出原理や特徴について述べたように、既存の検出手法において、すでに高感度・高速な手法そのものは数多く存在している。その一方で、本研究で目的とする携帯型の定量検出手法について着目すると、従来の手法はいずれも PC や顕微鏡など大型の解析機器を前提としたシステムとなっている。改めて、携帯型の定量検出手法を前提とした時に、どのような測定原理を用いてバイオセンシングを行えば良いかという問いに対して考える必要がある。本研究では、導波モード共鳴効果が上記の問いに対する答えの一つとなると考え、導波モード共鳴効果を用いた携帯型医療診断技術システムについて述べた。

第 4 章ではスマートフォン上で検出することを前提とした **GMR** フィルタの設計および可変波長フィルタとしての諸特性について理論・実験の双方から述べた。具体的には、特殊な追加加工・プロセスを必要とせずに **GMR** フィルタの共鳴波長を制御する手法を提案している。**GMR** フィルタの共鳴波長を制御する手法として主に、**GMR** フィルタへと入射する光の入射角制御が主たる方法であった。これに対して本研究では、**GMR** フィルタへの入射角を固定した状態で **GMR** フィルタを水平回転させることで、**GMR** フィルタからの反射波長を制御する事が可能である事を示した。実証実験として、半導体の微細加工

技術を用いた可視光領域用に設計された GMR フィルタを実際に作製し、走査型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡を用いた構造評価を行うとともに、分光器を用いて光学特性を測定した。その結果、一次元周期構造を有する GMR フィルタの水平回転により 500nm～1100nm の広い範囲で任意の波長を取り出せることを明らかにした。

第 5 章では、作製した GMR フィルタを、生体物質の検出素子、すなわちトランスデューサとしての機能について検証を行った結果について述べた。GMR フィルタを用いた生体物質の検出は、より正確に述べると GMR フィルタ表面上の生体物質に起因する屈折率変化を検出することである。ここでは、NaCl 溶液を用いた GMR フィルタ表面の屈折率変化に対する感度応答性について評価を行った。最終的に、実証実験として生化学分野で多用されているアビジン-ビオチン反応を用いた生体物質の検出を行い作製した GMR フィルタがバイオセンサとして実際に機能することを実証した。

第 6 章では本研究の目的でもある携帯型の機器利用を前提とした検出手法について述べた。実際にスマートフォンを用いた携帯型医療診断システムを構築するとともにスマートフォン上でも生体物質の定量検出が可能である事を示した。

第 7 章では GMR フィルタの高感度化、すなわち検出限界を改善する手法を提案した。従来の手法では、GMR フィルタ構造を制御した構造最適化に着目した研究が行われている。しかし現実問題として、提案された構造を実現するうえでのプロセスの最適化や実現が困難であるという課題を有していた。本研究では、ナノサイズの磁性粒子を GMR フィルタ上の生体物質に追加で固定化することで検出限界付近の信号についても増幅する事が可能であることを示した。アビジンを用いた実験の結果、磁性粒子を用いた場合について、変化量が約 4 倍に増幅されるという結果が得られており、本手法の有用性が明らかになった。

第 8 章では本研究の結論と今後の課題・展望についてそれぞれ述べた。今後の展望として近年急速に成長してきている AI(人工知能)技術を GMR フィルタに組み合わせた研究領域の実現を提案している。既存の GMR フィルタを用いた検出・測定手法に着目するとイメージセンサのような光電変換素子上での局所的な特徴量変化にのみ着目しているが、ここでは、イメージセンサ上で得られる信号について AI 技術を用いた解析によるセンシング手法の実現可能性について述べている。第一段階の取り組みとして AI で学習させた予測モデルを用いた NaCl 溶液の濃度推定の実証実験を行った結果、理論値と 1%以内の誤差で結果が得られており本手法の有用性について述べている。

目次

1. 序論.....	9
1.1. 背景	9
1.2. 目的	10
1.3. 本論文の構成	12
2. バイオセンシング	13
2.1. はじめに	13
2.2. 受容体	13
2.2.1. タンパク質の基本構造	13
2.2.2. タンパク質の 2 次元構造	15
2.2.3. タンパク質の高次構造	17
2.2.4. 抗体・抗原反応	18
2.3. バイオセンサ	20
2.3.1. バイオセンサの概観	20
2.3.2. 光学的手法を用いたバイオセンサ	25
2.3.3. 質量測定ベースのバイオセンサ	28
2.3.4. FET バイオセンサ	29
2.4. サマリー	30
2.5. 参考文献	31
3. 導波モード共鳴効果	32
3.1. はじめに	32
3.2. 歴史概観	32
3.3. 原理	35
3.4. 導波モード共鳴効果フィルタの応用事例	49
3.4.1. 構造制御に基づくカラーフィルタへの応用	49
3.4.2. 機械的制御手法に基づく GMR フィルタの応用	51
3.4.3. 導波モード共鳴効果を用いたラベルフリーバイオセンサ	53
3.5. GMR フィルタを用いた携帯型医療診断システムの提案	55
3.6. サマリー	56

4. 導波モード共鳴効果を用いた可変波長フィルタの作製	60
4.1. はじめに	60
4.2. 概観	61
4.3. 原理	63
4.4. 微細加工技術を用いたセンサの設計	66
4.5. 作製した GMR フィルタの特性評価実験	73
4.5.1. 構造評価	73
4.5.2. 光学的特性の評価	73
4.5.3. 可変波長フィルタの特性評価実験	73
4.6. 実験結果・考察	75
4.6.1. 構造評価	75
4.6.2. 基礎光学的特性の評価	76
4.6.3. 可変波長フィルタの光学的特性の評価	77
4.7. サマリー	81
4.8. 参考文献	82
5. GMR フィルタを用いた生体物質の検出	83
5.1. はじめに	83
5.2. 生体物質の検出原理	83
5.3. 実験方法	84
5.3.1. 屈折率変化に対する変化特性	84
5.3.2. 流路アタッチメントを用いた屈折率変化の測定実験	89
5.3.3. アビジン・ビオチンを用いた生体物質の検出	93
5.4. 実験結果・考察	100
5.4.1. 屈折率変化に対する変化特性	100
5.4.2. アビジン・ビオチンを用いた生体物質の検出	101
5.5. サマリー	102
5.6. 参考文献	103
6. スマートフォンを用いた携帯型医療診断システムの開発	104
6.1. はじめに	104
6.2. 携帯通信端末の世界における現状	106
6.2.1. スマートフォンの現状	106

6.2.2. 途上国における ICT の現状.....	106
6.2.3. 携帯通信端末のモバイルヘルスの応用.....	108
6.3. スマートフォンを用いた分光分析システムの開発	110
6.3.1. 分光器の測定原理	110
6.3.2. 分光器アタッチメントの設計・作製	113
6.3.3. 解析手法.....	115
6.4. 実験方法	117
6.4.1. 屈折率変化の検出実験	117
6.4.2. スマートフォンを用いた生体物質の検出	118
6.5. 実験結果・考察	119
6.5.1. 屈折率変化の検出	119
6.5.2. スマートフォンを用いた生体物質の検出	121
6.6. サマリー	127
6.7. 参考文献	128
7. 磁性粒子を用いた生体物質の高感度検出手法の確立.....	129
7.1. はじめに	129
7.2. 高感度検出手法の提案.....	129
7.3. 磁性粒子	131
7.3.1. 磁性粒子標識	131
7.3.2. 磁性粒子を用いた生体物質の検出	132
7.4. 実験方法	135
7.4.1. アミド結合を用いた磁性粒子の固定化実験	135
7.4.2. 磁性粒子を用いたストレプトアビジンの高感度検出	137
7.5. 実験結果・考察	139
7.5.1. 化学結合を用いた磁性粒子の固定化	139
7.5.2. 磁性粒子を用いたストレプトアビジンの高感度検出	142
7.6. サマリー	144
7.7. 参考文献	145
8. 結論.....	147
8.1. 結論	147
8.2. 今後の課題と展望.....	148

1. 序論

1.1. 背景

近年、患者の血液や尿から簡易なキット等を用いて、その場で高速に病状を診断するポイント・オブ・ケア診断(POCT)の実現に向けた研究が盛んに行われている。これまで、HIV 自己診断キットのようにイムノクロマトグラフィ法を用いた診断手法や標識不要で検体を検出できるラベルフリーセンサの開発に関する研究が多数報告されてきている [X. Fan et al., *Anal Chim Acta* 620, 8 (2008)]. しかし、救急医療における POCT 技術は依然として課題を抱えている。その 1 つが、大型の分析設備を備える医療施設でしか定量分析ができないことである。特に安全域が狭い内服薬(抗痙攣剤やリチウム、ジギタリス等)の投与時などの、濃度の情報が必要となる場面において迅速かつ高精度な定量手法の実現が望まれている。これらの研究が進んでいない原因として、従来の定量診断法は主に蛍光物質を標識とする光学的手法を用いており解析を行うために大型設備の利用を前提としていることが挙げられる。

ここにおける問題点は、POCT の実現のために様々な要素技術が開発されてきたにもかかわらず、持ち運び可能でありながら迅速な定量検出を同時に実現するためのアプローチが欠如していることである。すなわち、(1)携帯型の装置での分析を前提とした(2)検体の定量検出が可能であるバイオセンシング手法を提案する事によって、従来では不可能であった救急車内での定量診断が可能となり、新たな POCT 向けの医療診断技術の指針が得られることが期待できる。

1.2. 目的

本研究の目的は既存の蛍光標識を用いた定量検出手法と同程度またはそれ以上の感度を持つ携帯型の定量検出手法を開発する事である(図 1). 現状の問題点を踏まえたうえで, 携帯型の定量検出手法を実現するうえで以下の3点を具体的な目的として定めた.

1. 蛍光標識を必要とせずに生体物質の定量検出を行う事が可能なバイオセンサの開発

ELISA 法(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)など従来の定量検出手法で大型の解析装置が用いられる要因は, 主に標的物質に蛍光標識を修飾して得られる微弱な光信号を検出・解析する必要があることに起因する. 本研究では標的物質の検出のために特殊な標識を必要としないラベルフリーバイオセンサを用いる事に着目した. 具体的には, スマートフォン上で検出する事を前提とした光学式ラベルフリーバイオセンサを実際に設計・作製して基礎特性評価を行う.

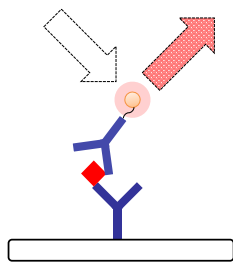
2. スマートフォン上でセンサからの信号を分析するための分光測定システムの開発

光学式バイオセンサから得られる信号をスマートフォン上で検出する仕組みを提案する. 持ち運び可能な装置でバイオセンサからの情報を読み取り標的物質を定量するために, カメラや通信機能, PC に匹敵する情報処理能力を有するスマートフォンを用いた分光測定システムを開発する.

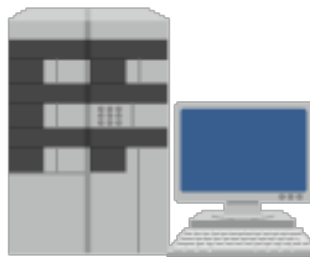
3. 磁性粒子を用いた高感度検出手法の実現

携帯型の定量検出手法を確立したうえで, 極低濃度の生体物質を検出するための高感度検出手法を提案する. 本研究では磁性粒子と呼ばれる外部磁場によって操作可能な粒子を用いることでセンサから得られる信号を増幅させる事が可能であることを示す.

従来



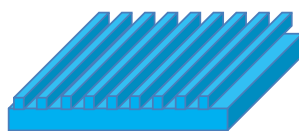
蛍光標識



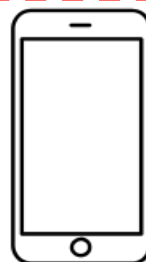
大型解析装置

⇒ 大型の施設での利用に限定される

提案手法



GMRセンサ



スマートフォン

⇒ 携帯型の機器で定量分析を実現

図 1 携帯型の機器を用いた定量分析

1.3. 本論文の構成



図 2 博士論文の構成

2. バイオセンシング

2.1. はじめに

医療診断を支える技術であるバイオセンシングは、生化学や電気工学、半導体技術など多岐に渡る分野の知識が横断的に必要となる。しかし、主な構成としては、(1)標的を検出する受容体、(2)物理量を電気信号に変換する素子であるトランスデューサ、(3)信号を検出するための検出器・システムが組み合わさる形で構成される。本章ではこれらの構成要素についてそれぞれの特徴および基礎的な事項について述べる。

2.2. 受容体

2.2.1. タンパク質の基本構造

タンパク質はほとんどすべての生物学的過程において大きな役割を果たしている。例えば、タンパク質は、ヒトの筋肉および内臓器官の構成成分であり、肌色やアルコール耐性などの人固有の特性はタンパク質によって決定される。人体におけるタンパク質は、ホルモンや酵素、抗体など多岐に渡り存在している。

タンパク質そのものは分子量が数万から数十万で構成される高分子であり、その構成材料はアミノ酸である。アミノ酸はアミノ基(-NH_2)とカルボキシ基(-COOH)を有する低分子の有機化合物であり、タンパク質の材料としてのアミノ酸は、側鎖(図 3 中の[R]の場所)によって 20 種類に分類される。この側鎖によって疎水性や親水性、水溶性などの特徴が変化することが知られている。

アミノ酸は両性電解質であり、塩基性であるアミノ基と酸性を示すカルボキシ基をそれぞれ有するという特徴がある。これらの基はそれぞれ、水溶液中において、アミノ基が水素イオンと結合して -NH_3^+ へと、カルボキシ基がプロトンを解離して -COO^- となる。

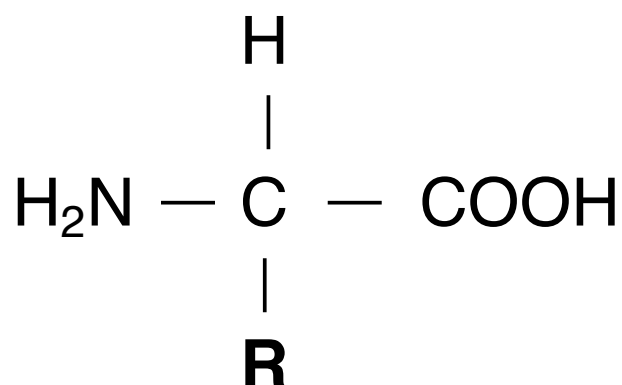


図 3 アミノ酸の一般式

アミノ酸は図 4 に示すように、一方のアミノ酸と他方のカルボキシ基の間で水が外れることで結合する。この結合はペプチド結合と呼ばれており、タンパク質は結合数が数百を超える結合数を有している。ペプチド結合によって形成されるアミノ酸のつながりを一次構造と呼び、図 4 のように必ず直鎖状に形成されることが知られている。直鎖の両端は必ず自由なアミノ基やカルボキシ基が残っており、それぞれアミノ末端(N 末端)、カルボキシ基末端(C 末端)と呼ばれている。タンパク質が一次構造のみで存在することはなく、主に一次構造のタンパク質同士が無数に連なり二次元、三次元構造を形成することでタンパク質固有の機能が発現する。[1]



図 4 タンパク質の一次構造

2.2.2. タンパク質の2次元構造

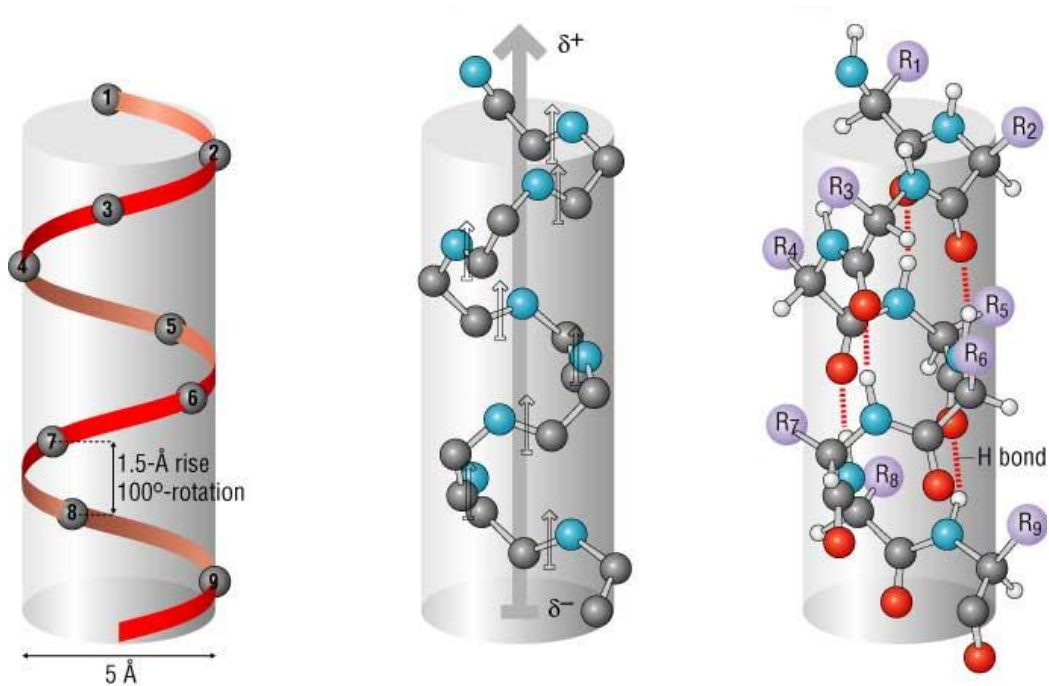
隣接するアミノ酸同士がペプチド結合によって鎖状につながれる際、実際は空間的に折り畳まれて一定の構造を示す。この時、局所的な構造は二次構造と呼ばれており、

① α ヘリックス 図 5 (a)

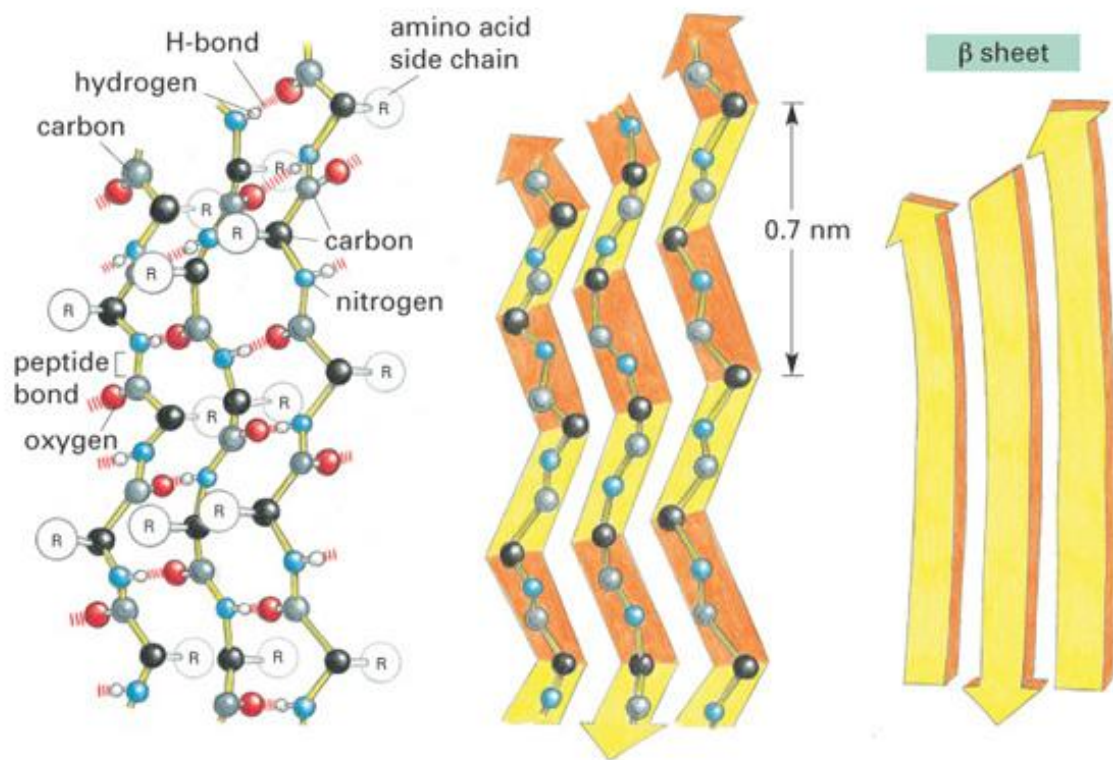
② β シート 図 5 (b)

のそれぞれが代表的な構造として知られている。[2]

α ヘリックスはアミノ酸 3.6 個ごとに 1 回転するらせんを描くようにペプチド結合が形成される構造となっており、(1)構造が安定している、(2)アミノ酸の側鎖が全て外側に向いているなどの特徴を有する。一方で、 β シートはアミノ酸同士のペプチド結合の繰り返しにより一次構造の鎖同士が水素結合により結びつくことで帯のような層板構造が形成される。 β シートも α ヘリックスと同様で、構造が安定しているという特徴を有している。



(a)たんぱく質の2次元構造： α ヘリックス



(b) たんぱく質の2次元構造：βシート

図 5 タンパク質の構造

2.2.3. タンパク質の高次構造

タンパク質は一次構造や二次構造による複合体を形成するとともに、その全体が空間的に折り畳まれて固有の空間的構造を形成する。この構造は三次構造と呼ばれており図 6 に示すような形を形成する。

細胞や抗体、酵素などのタンパク質は高分子でありながらも、主に血中、すなわち水溶液中に分散している。これは、タンパク質の多くが三次構造を形成する際にアミノ酸の親水性側鎖をタンパク質表面に出す形状で構成されていることに起因している。

酵素や調節タンパク質のように複数種類のタンパク質が会合して機能する場合も存在する。これを四次構造と呼び、代表的例として血中において酸素を運搬するヘモグロビンが挙げられる。

これまで述べたようにタンパク質は多種多様な高次構造を形成する。この時に形成される高次構造を維持する際には主に、アミノ酸同士のペプチド結合やジスルフィド結合と呼ばれる共有結合の他にも、水素結合や静電的結合、疎水結合などの弱い結合力がそれぞれ重要な役割を果たしている。

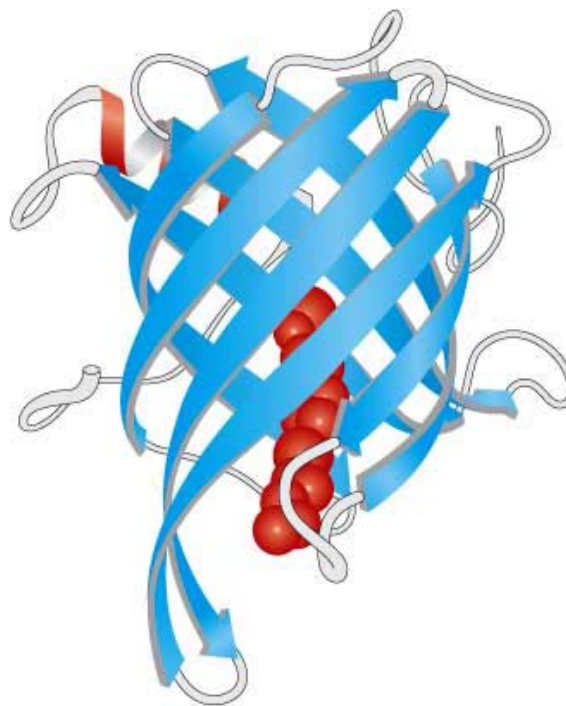


図 6 タンパク質の三次元構造

2.2.4. 抗体・抗原反応

バイオセンシングを考える上で最も重要なタンパク質の一つが抗体である．一般的にバイオセンサは人間の免疫系・システムを模倣する形で構成される．免疫系は，体内に侵入した病原体・ウイルスなどの外敵に対してそれらを異物と認識して，特異的に破壊，除去する仕組みを有する．この中でも，異物を特異的に検出するための仕組みとして人体内において抗体・抗原反応が用いられている．

抗体は免疫グロブリン(immunoglobulin)と呼ばれており，補体結合などに関与する構造部分の相違にもとづいて五つのクラス(IgG, IgM, IgA, IgE, IgD)にそれぞれ分けられている．これらの抗体の基本的な構造はそれぞれよく似ている．図 7 は抗体の基本構造を示す．抗体は基本単位として二種類のポリペプチド鎖の各 2 本，すなわち 4 本のポリペプチド鎖から構成されている．この時，ポリペプチド鎖は分子量がそれぞれ異なっており，ペプチド鎖が長い方を H(Heavy)鎖，短い方を L(Light)鎖とそれぞれ呼ぶ．抗体中の 2 本の H 鎖間はジスルフィド結合により架橋されている．[3]

抗原の結合に関与するのは抗体の Y 字のそれぞれの先端部に存在する H・L 鎖の N 末端の領域であり，その構造は約 110 個のアミノ酸で構成される．抗体の末端領域は可変性に優れており標的物質に対してのみ特異的に結合するように立体構造が形成されている．抗体と抗原の結合は共有結合ではなく，接触面におけるアミノ酸残基間に働く総合力と考えられている．総合力は主に以下の力が挙げられる．

- ① ファンデル・ワールス力
- ② 水素結合
- ③ 静電的相互作用
- ④ 疎水性相互作用

どの作用が最も強く影響するかは抗体・抗原の組み合わせによって異なっている．バイオセンサでは，センサ表面上に抗体を非特異的あるいはアミド結合などの結合手法を用いて固定化する．抗体の先端にある可変領域で標的物質を捕獲することで特異的に標的物質を検出することが可能となる．

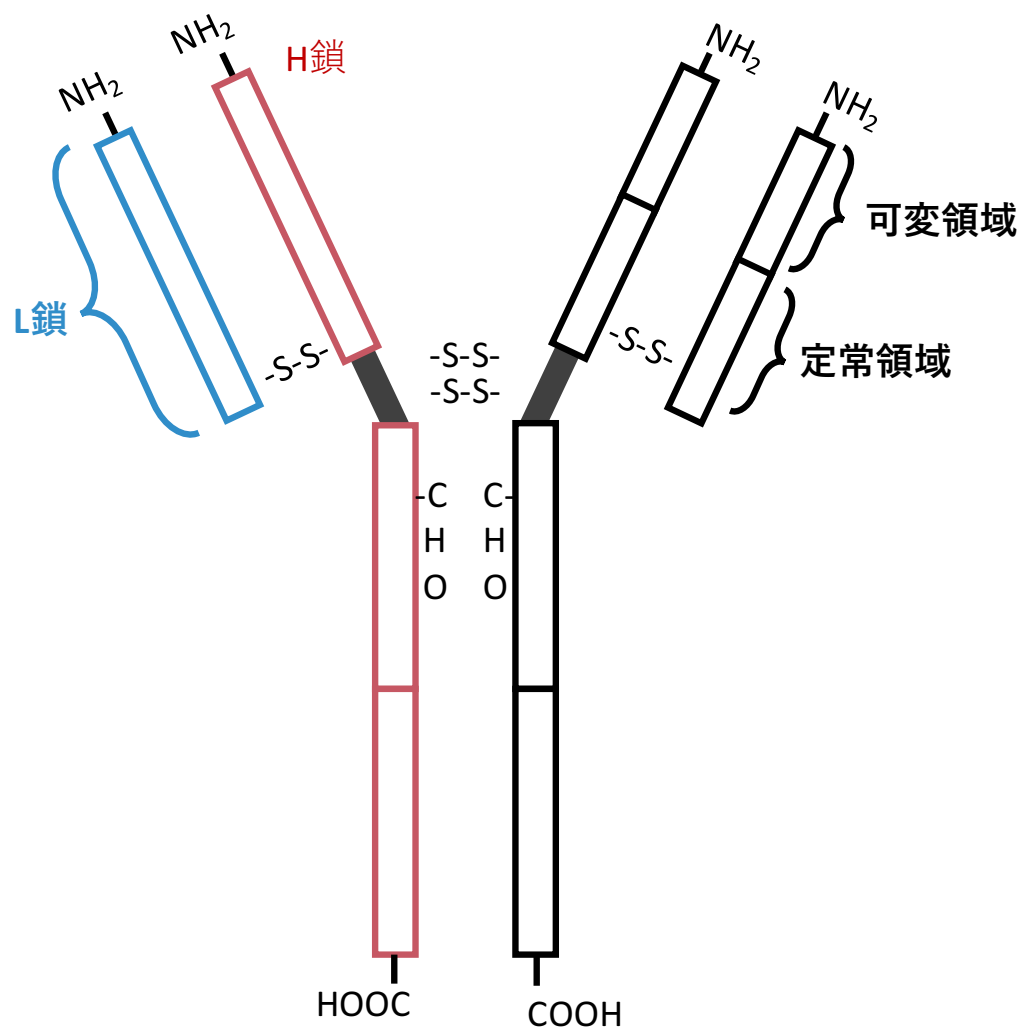


図 7 抗体の基本構造

2.3. バイオセンサ

2.3.1. バイオセンサの概観

バイオセンサは、サンプル溶液中から標的とする物質を選択的に検出・測定するために生物学的システムを用いる。バイオセンサを用いた測定システム(図 8)は主に以下の要素から構成される。

- ① 標的を特異的に認識するバイオレセプター(Biological receptor)
- ② 物理量を電気(電流・電圧)信号に変換するためのトランスデューサ
- ③ 変換された信号を検出するための検出器・システム

検出器は一般的に電気信号を検出する装置であり、信号処理や解析を行う系が含まれる。ここで測定される物理量は、音波や電気・磁気、機械的変位量が代表的な例として挙げられる。バイオセンサの開発を行うためには、これらの複合的な要素を目的に応じて最適な形で組み合わせる必要がある。そのため、生物学や化学、物理、工学、そしてコンピューターサイエンスなどの多岐に渡る分野の知見を横断的に組み合わせて統合する必要がある。これらの知見を有する人材が一つの施設・団体の中で全て揃う事は困難であるためバイオセンサの研究や開発は、主に機関間の共同プロジェクトや業界内が連携する形で取り組まれている。

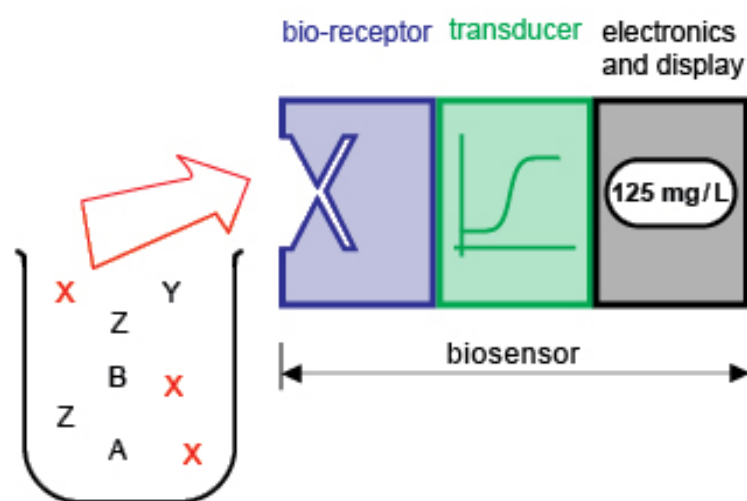


図 8 バイオセンシングの構成

生物学的サンプルの分析の大部分は、比較的高価な設備と熟練した人員を使用する研究室で行われている。従来、バイオセンシングを行うには洗浄や反応、機械操作などの数多くの工程が必要不可欠であった。近年では、検査の自動化が積極的に行われている。検査結果が数分または数時間で得られない場合は、システムを自動化することで分析時間や人の手による操作を省略できるように工夫されている。これとは対比的に、従来の培養技術を使用した微生物学的測定には数日から数週間を要する事がある。そのため、食品産業や製薬業界、医療業界などの業界においては、迅速かつ精確な診断結果が得られる手法の開発が求められている。この時、工場やベッドサイドのように研究所や専門機関以外の場所において診断が行われるため、訓練を受けていない人々の操作でも即時に信頼できる結果が安価に得られる事が求められている。

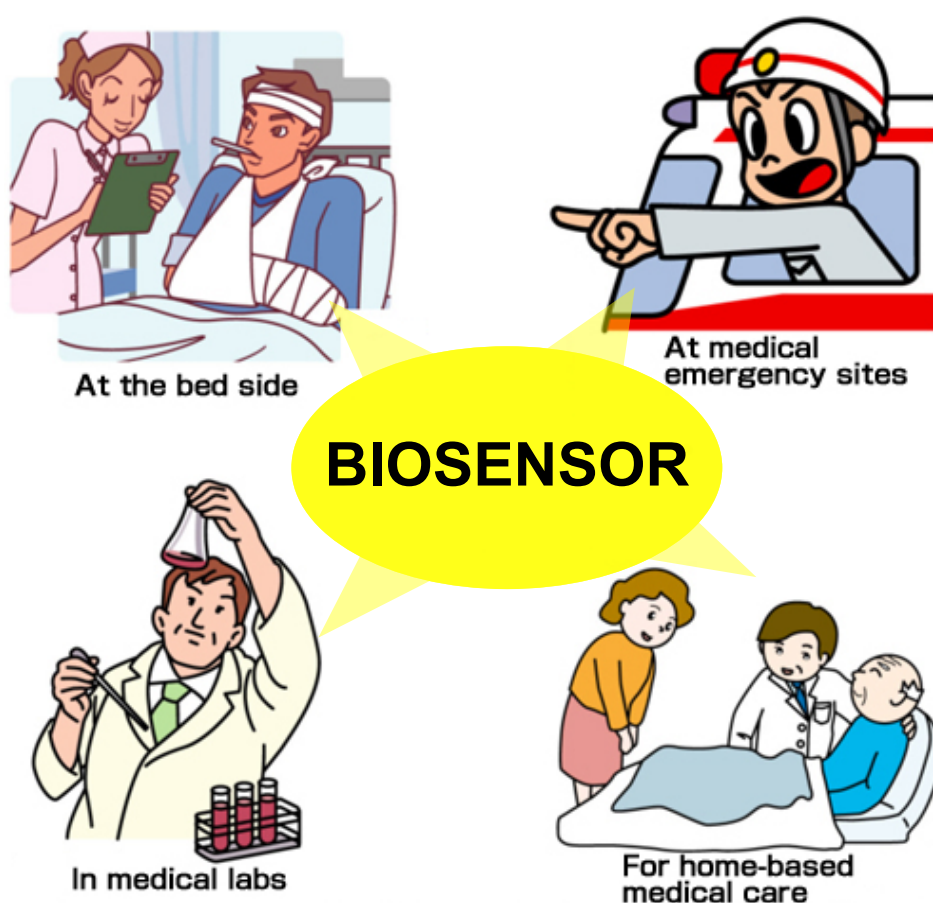


図 9 バイオセンサが用いられる場所

本研究で特に着目する臨床化学分析は、測定する対象が生体試料であるため通常の化学分析と比較すると以下に述べる特徴を有している。[4]

- ① 標的とする測定対象の成分含有量の分布が 100 mM~1 pM までと広域である (図 10)
- ② サンプルが患者の体液(おもに血液)であるためサンプル量が制限される
- ③ 多数の試料について迅速かつ正確な検査結果を示す必要がある。

上記の特徴を満たすためには、特異性や反応条件(pH や温度)を保障する必要があるため、化学試薬を用いる手法よりも生物化学的反応を利用して分析することが望ましい。

バイオセンサーを設計する上で求められる特徴は、現代の実験機器システムの設計と同様であり、理想的な POCT 向けバイオセンサは、以下の表 1 に示す特徴が求められる。

表 1 バイオセンサに求められる特徴

特徴
小型でロバスト性のある機器装置
操作に特殊なスキルを必要としない
短時間で検査可能
規格化や操作が機器に組み込まれている
機器が示すデータを容易に理解できる
pM 濃度, pM よりも低濃度の検出限界
複数の対象物質の同時測定が可能
製造コストが安価
追加試薬が不要である
測定試料が少量かつ容積計測が不要である

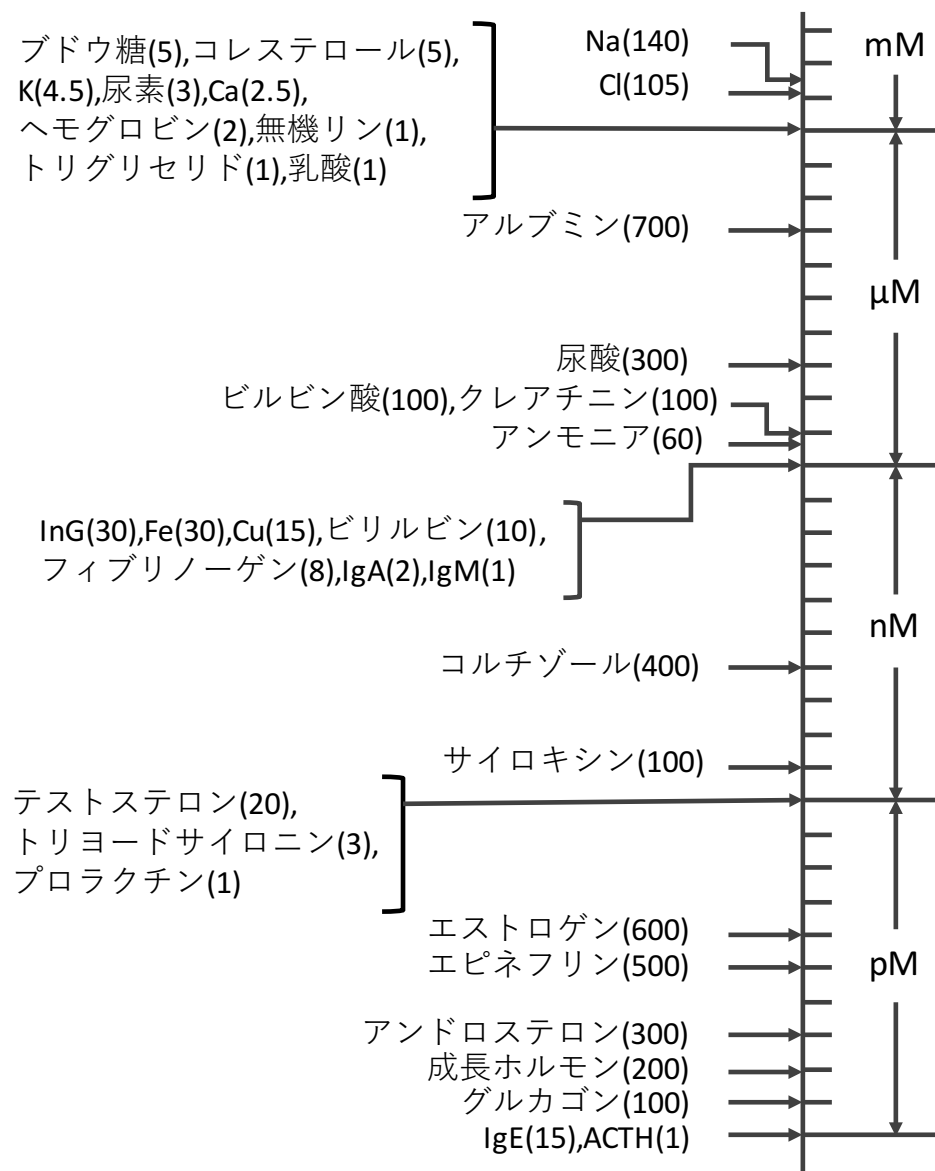


図 10 主な血清成分と検出範囲 [4]

図 11 はバイオセンサの構成図を示す．バイオセンサーは，分子認識材料とシグナルトランスデューサとの 2 つの主要部分から構成される．トランスデューサは，標的物質と認識部位との反応/相互作用を読み取りデータを出力する．したがって，バイオセンサの選択性および感度は，主に生体認識素子およびトランスデューサによって決定される．生体認識材料は，一般的には酵素，微生物または組織材料などの生体触媒，または抗体および核酸 [5-6] などの親和性に基づくものが用いられる．加えて，トランスデューサには，光学，質量，電気化学的手法を用いた検出器が広く用いられている．

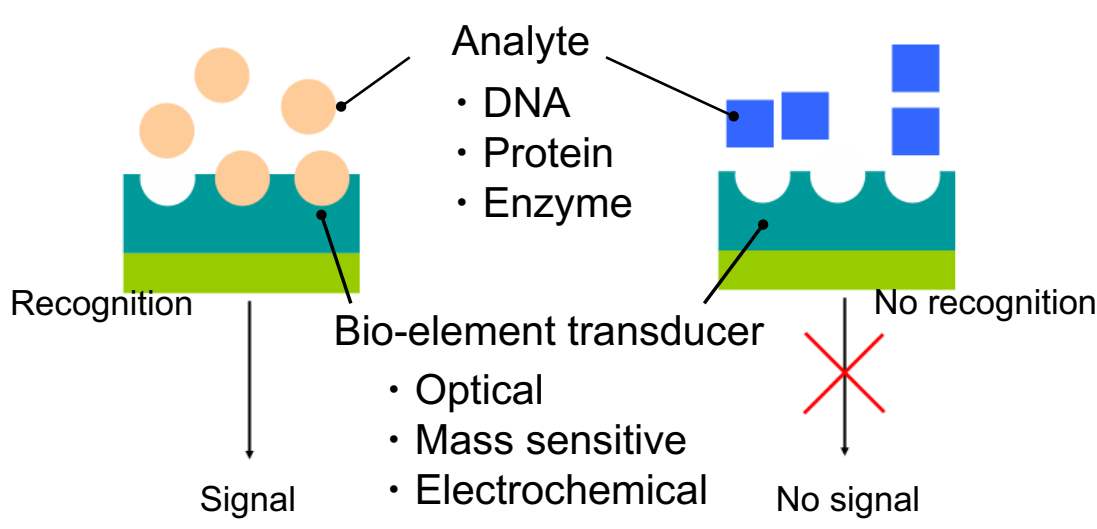


図 11 バイオセンサの模式図

表 2 はバイオセンサの一例を示す．バイオセンサは対象とする試料に応じて反応部とトランスデューサの組み合わせを検討する必要がある．

表 2 測定対象の違いによるトランスデューサの組み合わせ

反応基質	トランスデューサ	測定対象
抗原・抗体	電極,水晶振動子	ウイルス等の感染症
酵素(蛍光標識)	CCD, フォトダイオード	抗体・抗原,DNA
化学物質	蛍光分光光度計	ビタミン, 化学物質

2.3.2. 光学的手法を用いたバイオセンサ

2.3.2.1. SPR(Surface Plasmon Resonance)

図 12 に示すように金属薄膜表面に対して全反射するように光を入射すると、ある角度で入射した光は吸収されるためこの角度に対応する光は反射光の強度が減少するという現象が生じる。全反射が生じている界面では表面を伝搬する波(エバネッセント波)が存在している。一方で金属薄膜にも表面プラズモン(Surface Plasmon Resonance : SPR)といわれる表面波が生じる。これらの波の波数がそれぞれ一致することによって共鳴が生じる。この時、入射光のエネルギーの一部が表面プラズモン波を励起するため、金属表面からの反射光の強度は減少する。[7]

SPR の波数 k_{sp} は以下の式で与えられる。

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon n^2}{\epsilon + n^2}}$$

また、エバネッセント波の波数 k_e は以下の式で与えられる。

$$k_e = k_p \sin \theta$$

k_p は入射光の波数ベクトル、 ω は角振動数、 c は光速度、 ϵ は金属の誘電率、 n は金属表面に接する媒質の屈折率、 θ は入射角をそれぞれ示す。 k_{sp} と k_e が一致すると、入射光のエネルギーの一部は表面プラズモン波の励起に用いられる。この時に、入射光の角度 θ と媒質の屈折率 n との関係が決まる。すなわち、光の強度が減少する角度は、反射面と反対側の金属表面の溶液の屈折率に依存するため、反射光の角度に対する反射強度の測定によって、金属表面の生体物質や化学物質の付着を検出することが可能である。このような原理を用いたセンサを表面プラズモン共鳴センサと呼ぶ。SPR センサは表面近傍の媒質のみ影響を受けるため、たんぱく質同士の相互作用を求めることやリアルタイムでの測定も行うことが可能であることから反応速度定数を求めるなど、今日のバイオテクノロジー分野の発展を支えている。

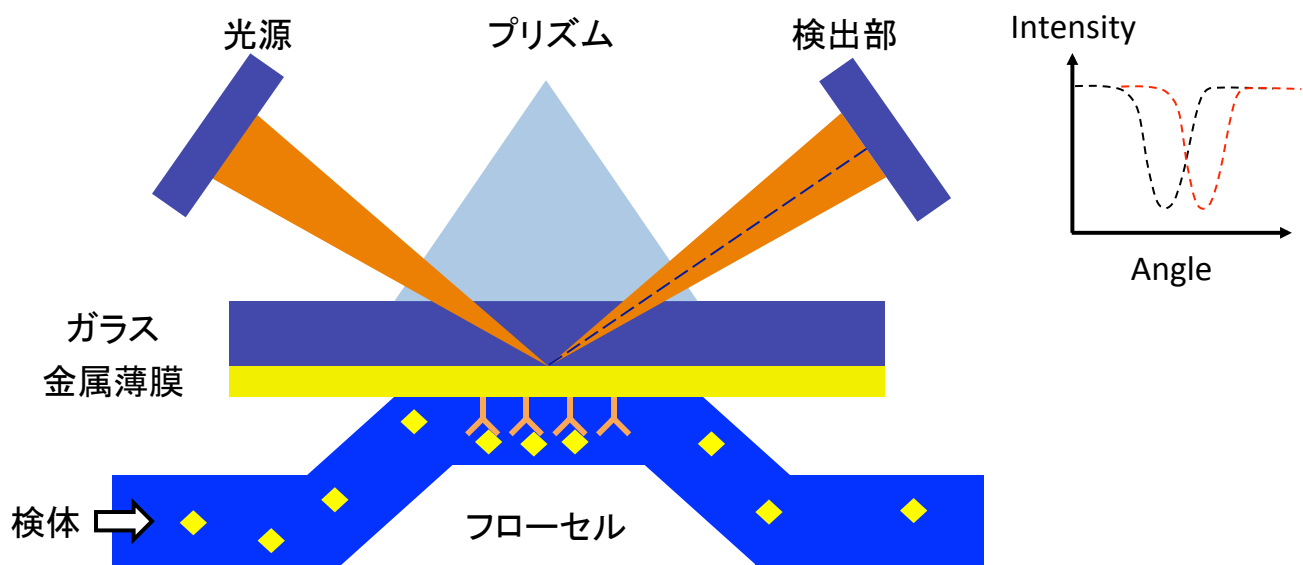


図 12 SPR の概念図

2.3.2.2. 蛍光検出法

図 13 は蛍光検出法の概要を示す。蛍光検出法とは、標的物質に蛍光色素を付与し、顕微鏡や CCD センサを用いて検出する方法である。具体的には、蛍光修飾された抗体を測定サンプル(抗原を含む溶液)と反応させた後、励起光(Excitation)を照射することで蛍光(Emission)を発生させる。蛍光色素が吸収した光エネルギーの波長と蛍光として放出される波長は、理論上同じ値になる。しかし、実際には蛍光色素から放出される波長は励起光の波長よりも高波長側(低エネルギー)にシフトして出てくる。これら 2 つのピーク波長の差をストークシフト(Stokes shift)と呼ぶ。蛍光放出以前の励起状態の際に放出されたエネルギーが熱エネルギーへと変換されることで生じる。ストークシフトによる蛍光波長のシフトによって、蛍光検出を行う際に励起光の影響を防ぐことが出来る。そのため、蛍光観察を行う機器は、蛍光色素から放出される波長に応じて光学フィルターを導入している。ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)や吸光度測定などで蛍光検出法が応用されている[8]。

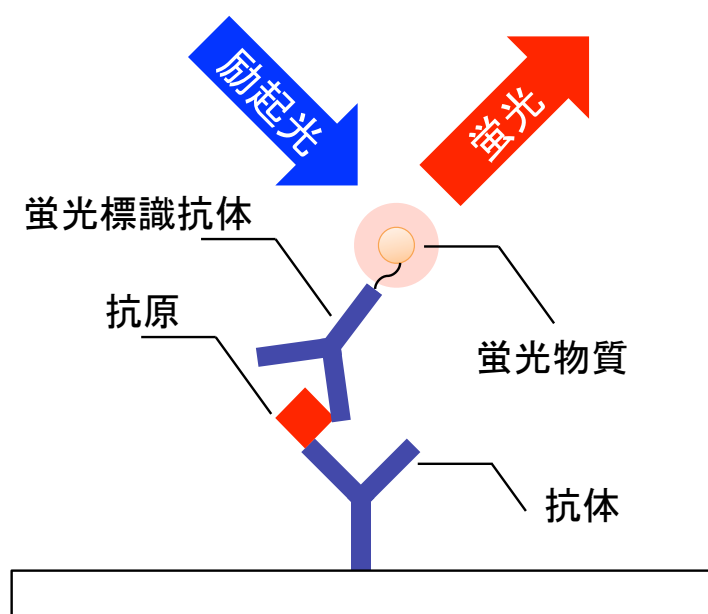


図 13 蛍光検出法

2.3.3. 質量測定ベースのバイオセンサ

2.3.3.1. QCM

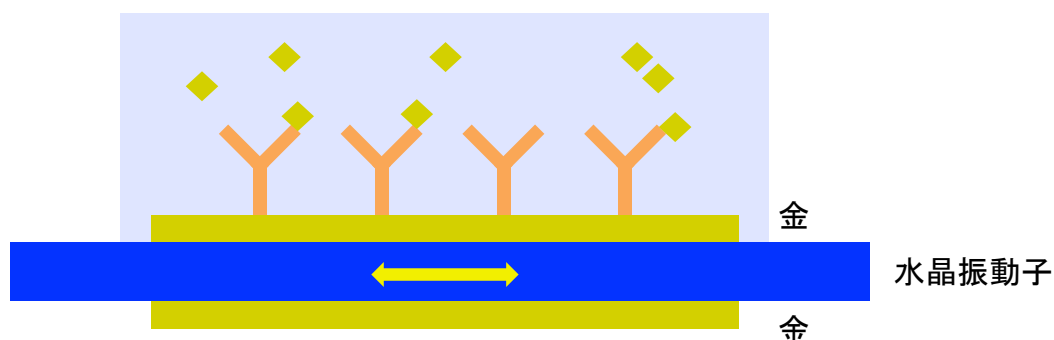
図 14 は水晶振動子センサを用いたバイオセンシングの概要を示す。水晶振動子センサ (Quartz Crystal Microbalance: QCM) は、水晶振動子の周波数が電極表面に付着した物質の質量に応じて変化するという現象を用いた重さセンサである。主に薄膜の膜厚計やガスセンサとして広く用いられている。

QCM センサの質量変化に伴う周波数変化は以下に示す Sauerbrey の式で表される。

$$\delta_m = \frac{S \cdot \sqrt{\rho \cdot \mu}}{2 \cdot N \cdot F^2} \cdot (-\delta F)$$

δF は反応前後の周波数変化 [Hz], δ_m は反応した質量 [g], S は電極面積 [cm²], ρ は水晶の密度 (2.65 [g/cm³]), μ は水晶のせん断応力 (2.95 × 10¹¹ [g/cm·sec²]), F は公称周波数 [Hz], N はオーバートーン次数をそれぞれ示す。

上式によると、9MHz の水晶センサを使用した場合、周波数変移量 1Hz 当たりの質量換算は約 1ng/cm² となっており、質量変化に対して非常に感度が高いことが示される[9]。そのため、水晶振動子の電極表面に抗体や化学修飾を行った状態で試料と反応させると試料との相互作用を見ることができる。さらに、リアルタイムで経時変化を追うことが可能であることから分子間相互作用の研究やスクリーニングなどの多岐に渡る分野で用いられている。



$$\Delta f(\text{抗原質量}) = f_0(\text{抗体抗原反応前}) - f_1(\text{抗体抗原反応後})$$

図 14 水晶振動子センサを用いたバイオセンシング

2.3.4. FET バイオセンサ

バイオセンサにおいて、半導体センサーをトランスデューサーとして用いることで小型化することが可能となる。最も代表的なセンサとして FET(Field effect transistor, FET)バイオセンサが挙げられる。FET を利用したバイオセンサは、標準的な CMOS 作製技術を用いて FET を作製し、そのゲート電極表面上の変化から標的物質を検出する。ゲート電極表面上に抗体などの受容体を修飾した状態において生じる物理的変化は、抗原-抗体反応などの特異的反応に伴う荷電状態の変化のみである。すなわち、特異的反応に基づく荷電状態の変化を FET で検出することで標的物質を検出することが可能となる。[4]

図 15 は FET を用いた DNA のハイブリダイゼーションの例を示す。FET のゲート部には金が堆積してあり、そこに Au-S 結合を用いてチオール化 DNA を固定してある。そこに相補的な DNA の溶液を入れると DNA はハイブリダイゼーションし、二本鎖を形成する。DNA は負電荷に帯電しており相補的な結合によってゲートの電位変化が生じるためドレイン電流が変化する。この電流の変化を測定することにより DNA のハイブリダイゼーションを検出できる。

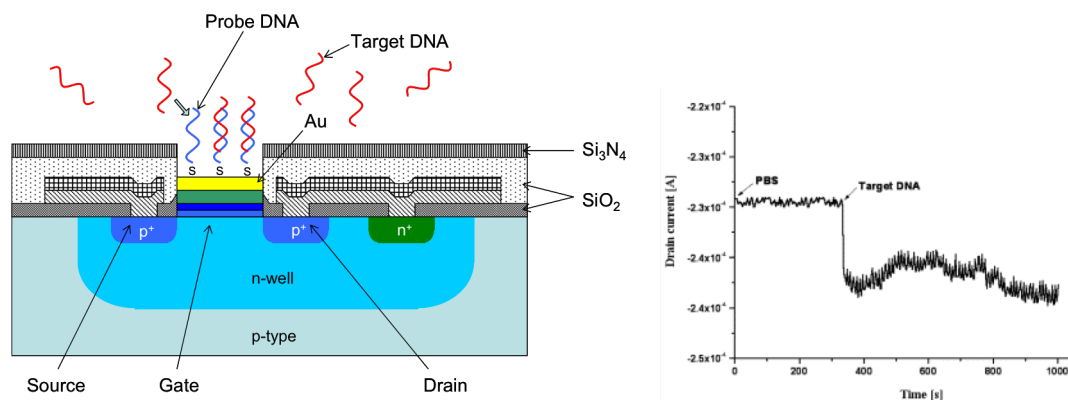


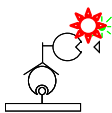

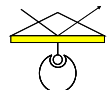
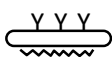
図 15 電界トランジスタの構造と検出例

2.4. サマリー

本章では、バイオセンシングを理解するうえで欠かせない要素である、タンパク質や受容体やバイオセンサの原理についての概観をそれぞれ述べた。

表 3 は主なバイオセンシング手法の特徴について比較した表を示す。ELISA 法や SPR のように pg/mL オーダーの検出感度を有する検出手法は既に存在する。しかし、これらの手法を用いて検査を行うためには大型の解析装置や PC などの機材が必要となるため持ち運んで使用することは不可能である。加えて、装置を扱う際には基板の洗浄工程や抗体の固定化・ブロッキング処理の最適化などの専門知識・高度な技術が求められる。そのため、ELISA を用いた検査は大学や病院，研究機関に限定される。対照的に妊娠検査薬や HIV 診断キットで用いられているイムノクロマト法は，高感度かつ持ち運び可能であることに加えて診断結果をその場で 30 分以内に得られる。従って対象物質の有無を検査する場合にはイムノクロマト法を用いた診断は最適な検査手法である。その一方で，得られる診断結果はあくまで対象物質の有無である。そのため，ジギタリスや抗痙攣剤のように標的物質の濃度の情報が必要となる検査で用いることは不可能である。ここにおける課題は，携帯型の定量検出手法を前提としたバイオセンシング手法が開発されていないことである。

表 3 主なバイオセンシング手法の特徴

手法		感度	性質	検出用標識	サイズ	価格	検査時間
酵素結合免疫吸着法 (ELISA法)		pg/mL	定量	蛍光標識	大型	高価	数時間
イムノクロマト法		pg/mL (Yes / No)	定性	金粒子	超小型	低価格	- 30分
表面プラズモン共鳴 (SPR)		pg/mL	定量	ラベルフリー	大型	高価	リアルタイム
水晶振動子マイクロ バランス法(QCM)		ng/mL	定量	ラベルフリー	大型	高価	リアルタイム

2.5. 参考文献

- [1] 井出利憲, 図解入門よくわかる分子生物学の基本としくみ, 秀和システム, 2007.
- [2] B.Alberts, D.Bray, K.Hopkin, et al, "Essential cell biology", GARLAND SCIENCE, 2004.
- [3] 金光修, 抗体工学入門, 地人書館 , 1994.
- [4] 鈴木周一, バイオセンサ, 講談社, 1984.
- [5] M.A. Arnold et al., CRC Crit. Revs. Anal. Chem., 20, 149 (1988).
- [6] T. Pelat et al., Antimicrob Agents Chemother. 51, 2758 (2007).
- [7] 笠井献一, 表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用したバイオセンサ, 蛋白質核酸酵素, 37, 15 , pp.2977-2984, 1992.
- [8] GE ヘルスケアバイオサイエンス, 蛍光検出の基礎知識 (1) .
- [9] バイオセンサ (QCM システム) , 日本電波工業株式会社 ,
<http://www.ndk.com/jp/products/search/biosensor/techinfo.html>.

3. 導波モード共鳴効果

3.1. はじめに

第2章では医療診断を行うための検出原理や特徴について述べたように、既存の検出手法において、すでに高感度・高速な手法そのものは数多く存在している。その一方で、本研究で目的とする携帯型の定量検出手法について着目すると、従来の手法はいずれもPCや顕微鏡など大型の解析機器を前提としたシステムとなっている。改めて、携帯型の定量検出手法を前提とした時に、どのような測定原理を用いてバイオセンシングを行えば良いかという問いに対して考える必要がある。この問いに対する答えの一つとして、本研究では導波モード共鳴効果と呼ばれる現象に着目した。

本章では、まずはじめに導波モード共鳴効果の歴史概観を紹介する。次に、導波モード共鳴効果の原理および実世界における応用例について述べた後に、携帯型医療診断システムにおける本手法の有用性について述べる。

3.2. 歴史概観

世界で初めて分光の概念が登場したのは、1666年にNewtonのプリズムを用いた太陽光のスペクトル観察実験である[1]。この実験を通じて、光が異なる色(波長)から構成されていることを発見したことで分光の概念が確立された。当時はプリズムによって光の成分を分解していたが、現在、光の分光分析を行う際には微細な周期的構造をフィルムあるいは表面上に形成された回折格子フィルムや反射型回折格子が用いられている。

回折格子の原型は18世紀にアメリカの科学者であるDavid Rittenhouseが作製したとされている。ここでは、板に固定された2本のネジの間に毛髪を並べて固定化してつくられた[2]。その後、1814年にフラウンホーファーによって改良型の回折格子が作製された。これによって、彼は太陽光のスペクトル中に570本の暗線が存在することを発見した[3]。これらはフラウンホーファー線と呼ばれており、太陽から発せられるスペクトルが地上に到達するまでに気体中のガスに応じて特定の波長の光が吸収されることによって生じる。

分光学が発展する一方で、回折格子の構造において生じる異常現象について発見・報告されてきている。初期に報告されている異常現象としては、1902年にWoodが電場偏光が格子溝(金属格子: metallic grating)に垂直である時に異常が生じることを報告している[4]。

この現象は **Wood's anomaly** として呼ばれており、現在では特定の波長において回折効率が上限に変動する現象として知られている。特にこの現象は回折次数の回折角が $\pm 90^\circ$ となる波長の時に生じる。理論的な解析は主に **Lord Rayleigh** によって行われた[5]。その後、1941年に **Fano** らは、金属回折格子における回折異常が回折効率が最大・最小となる場合で区別されることを示した[6]。**Wood** は電場偏光が格子溝に垂直であるときにのみ異常を観測したが、格子溝が十分に深い場合、偏光が溝に平行であるときにも異常が発生することが後に **Palmer** によって示された[7]。**Hessel & Oliner** は、1965年にこれまでに広く用いられていた散乱手法ではなく、誘導波に基づく **Wood** の異常を説明するための新しい理論的アプローチとして、回折格子によって生じた波によって生じる共鳴現象であることを示した[8]。

1973年に **Neviere** らによって波形のフォトレジストでコーティングされた誘電体導波路から構成される非金属格子構造によって回折された光について 2 種類の理論的研究を発表した。上記の構造を用いることで、入射光の偏光が格子溝に直交する場合と平行な場合の双方において、入射角に対して共鳴応答を示すことが示された[9]。**Neviera** らはこの現象から、導波路において光学モードが存在することに起因すると結論づけた。1985年に **Mashev & Popov** らが、波形の導波路において 0 次の反射回折波の異常が生じることを実験的に実証した。その中で、上記の構造からの反射波は、狭い波長帯域で非常に高効率な反射率を有することを示した[10]。1990年に **Gale** らも、誘電体を用いたグレーティング構造を用いることで可視光域における高効率な共鳴反射が生じる現象を実験的に実証し報告した[11]。

一連の回折異常に関する知見を統合する形で、**Wang & Magnusson** らが導波モード共鳴効果(**Guide Mode Resonance Effect : GMR Effect**)を報告した。ここにおいて、導波路中を伝搬する回折波が導波路のモードに結合することで、非常に狭帯域の反射波長であり、反射効率 100%に相当するフィルタが理論上作製可能であることを示した。その他にも、偏光フィルタ、カラーフィルタなど具体的な応用可能性について理論的に報告した[12-17]。**Magnusson** らによる導波モード共鳴効果の報告以後、多種多様な分野において **GMR** を用いる試みが広がってきている。

周期構造を有する誘電体構造において導波モード共鳴効果は生じるが、この現象は長い歴

史の中で数多くの研究グループ・分野の視点から取り組まれてきている．そのため，他分野の文献の中においてフォトニック結晶スラブやフォトニック結晶共振器の名称として取り扱われている場合も存在している．この時，ナノ周期構造を有する構造の特性については，フォトニックバンド構造などのようなバンド理論の観点から述べられる．

本論文においても，フォトニック結晶と知られる構造体と同様，ナノ周期構造を有するフィルタについて取り扱っている．なお本研究では上記の構造について“導波モード共鳴効果”の観点から取り扱っている．

3.3. 原理

本節では導波モード共鳴効果の物理現象について基礎的な光学特性の観点から述べる．前節の最後に述べたとおり，導波モード共鳴効果の現象そのものはフォトニックバンド構造やフォトニック共振器など様々なアプローチで語られている．本論文においては，導波モード共鳴効果の物理現象の概観について複数の要素の組み合わせでもって説明する．

導波モード共鳴効果の現象は大きく分けて 3 つの要素から構成される．(1)異なる屈折率を有する物質間で生じる全反射，(2)それに伴って生じるスラブ導波路中の光の導波現象，最後に(3)回折格子によって得られる回折光とスラブ導波路の相互作用である．

図 16 は低屈折率から高屈折率の媒質へと光が入射した時の光の様子を示す．低屈折率の媒質から高屈折率の媒質表面へと光を入射すると，媒質表面上での反射および屈折がそれぞれ生じる．この時，反射角 θ_{ref} は入射角と同等の値を示す．

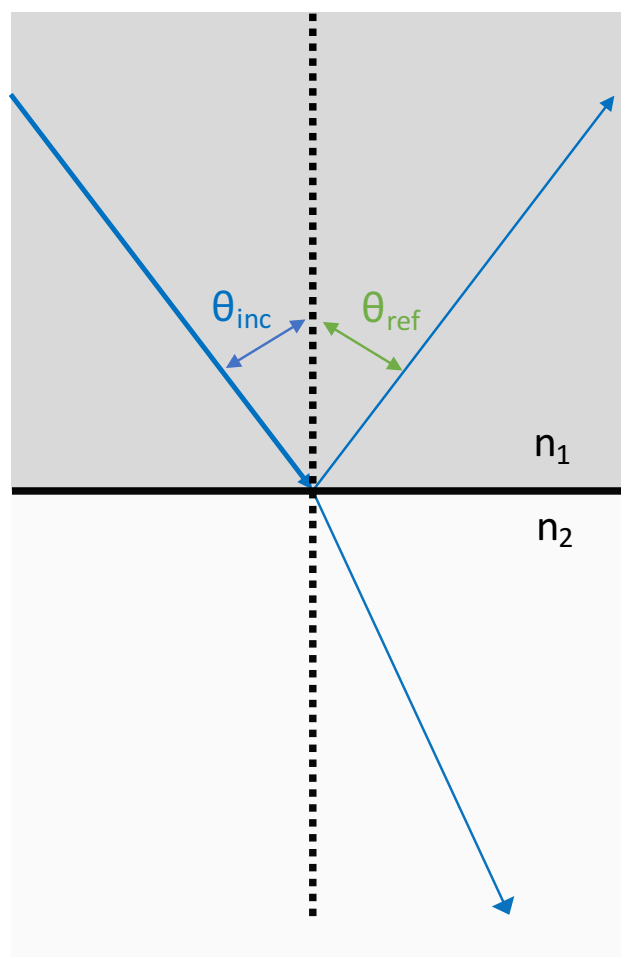


図 16 異なる媒質($n_1 > n_2$)への光の入射と反射

ここで，入射角が一定以上よりも大きくなると図 17 に示すように媒質表面で光が媒質の界面で全て反射する．この現象を全反射(Total reflection)と呼ぶ．水表面に空気中からレーザーポインタを照射する際に，一定以上の角度で入射すると水中に光が入らなくなる現象がこれに相当する．全反射が生じる角度を全反射角と呼び，全反射角 θ_c は

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right)$$

で与えられる．一例としてガラス($n=1.5$)と空気($n=1.0$)の場合，全反射角は 41.81° となる．

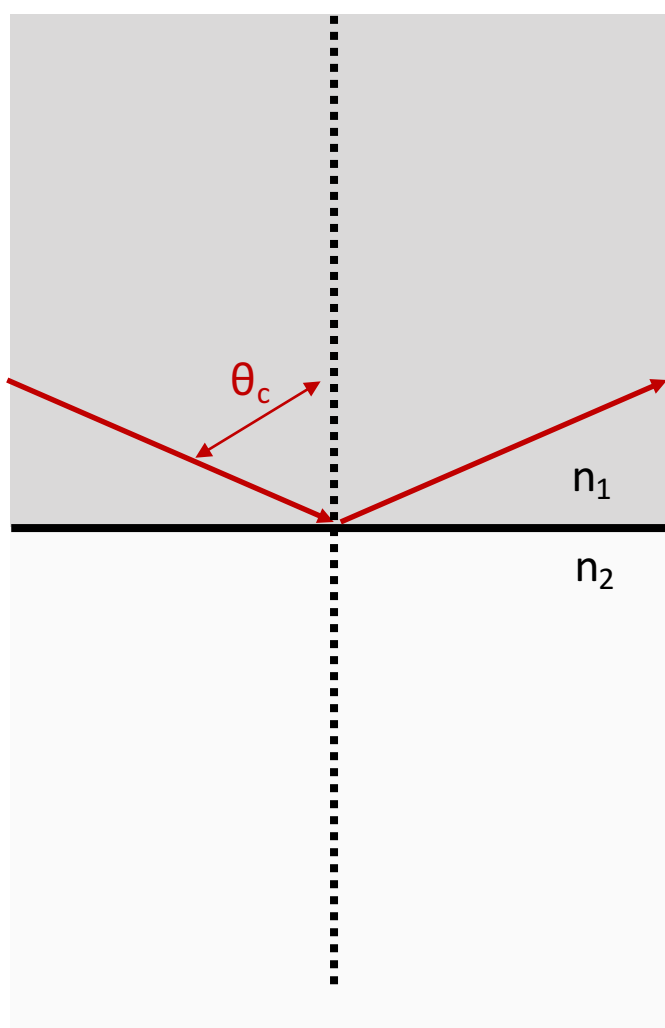


図 17 媒質間で生じる全反射の様子

次に、高屈折率を有する材料を 2 つの低屈折率材料で挟み込んだ構造を考える．具体的には図 18 に示すようなサンドイッチ構造($n_2 > n_1, n_2 > n_3$)を考える．この時に中央の材質中に光が一定以上の角度で入射された時に、上下の媒質の間で全反射を繰り返しながら光が中央の媒質中を進む現象が生じる．この形状によって光が導波される構造をスラブ導波路と呼ぶ．光ファイバも同様の原理で構成されており、光を伝送する箇所をコアと呼び周囲をクラッドと呼ばれる低屈折率材料で覆う構造を有している．

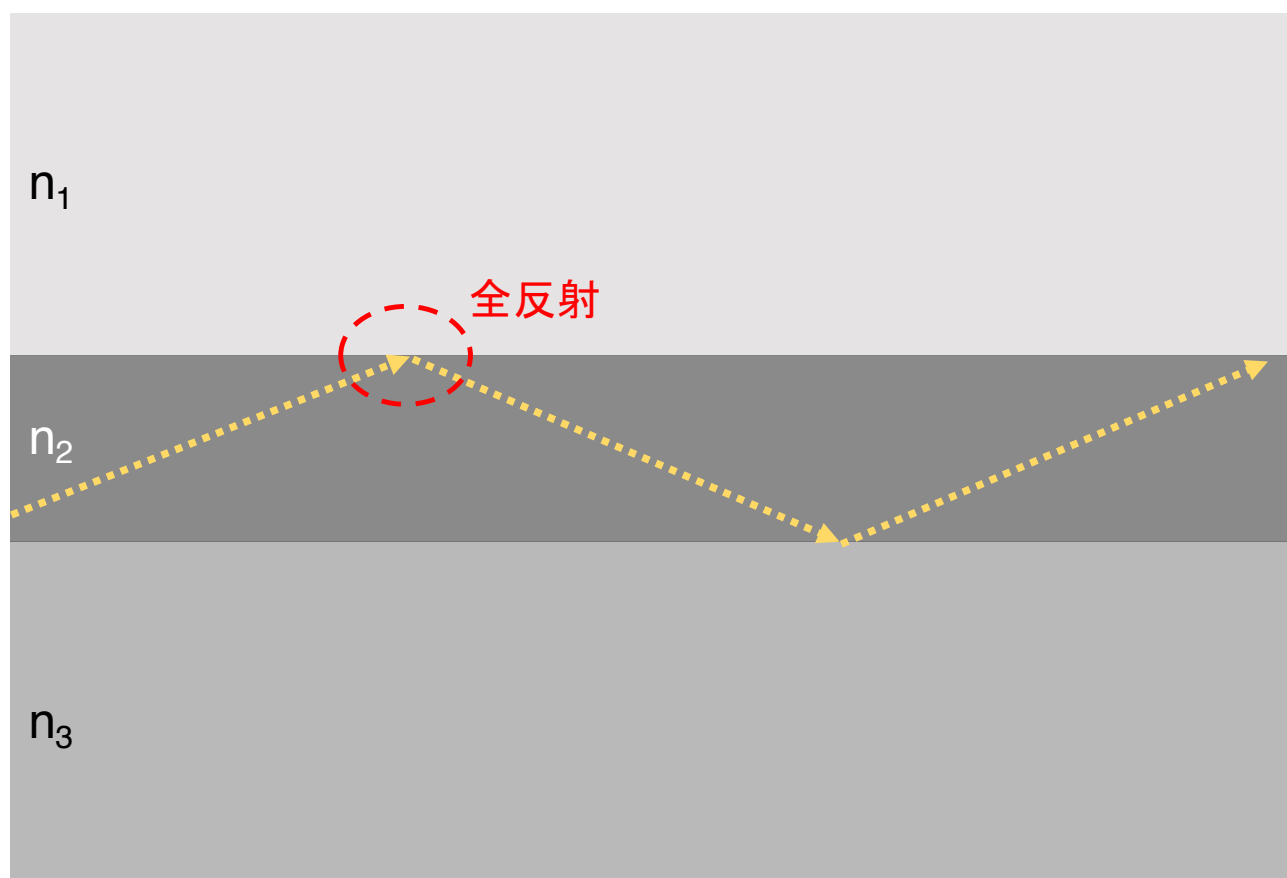


図 18 スラブ導波路内における全反射

上記の現象は巨視的にも観察することが可能であり、穴をあけたバケツから液体を放出した状態で液体中にレーザー光を導入すると、漏れ出す液体の中を光が全反射しながら進む様子が確認できる(図 19)．

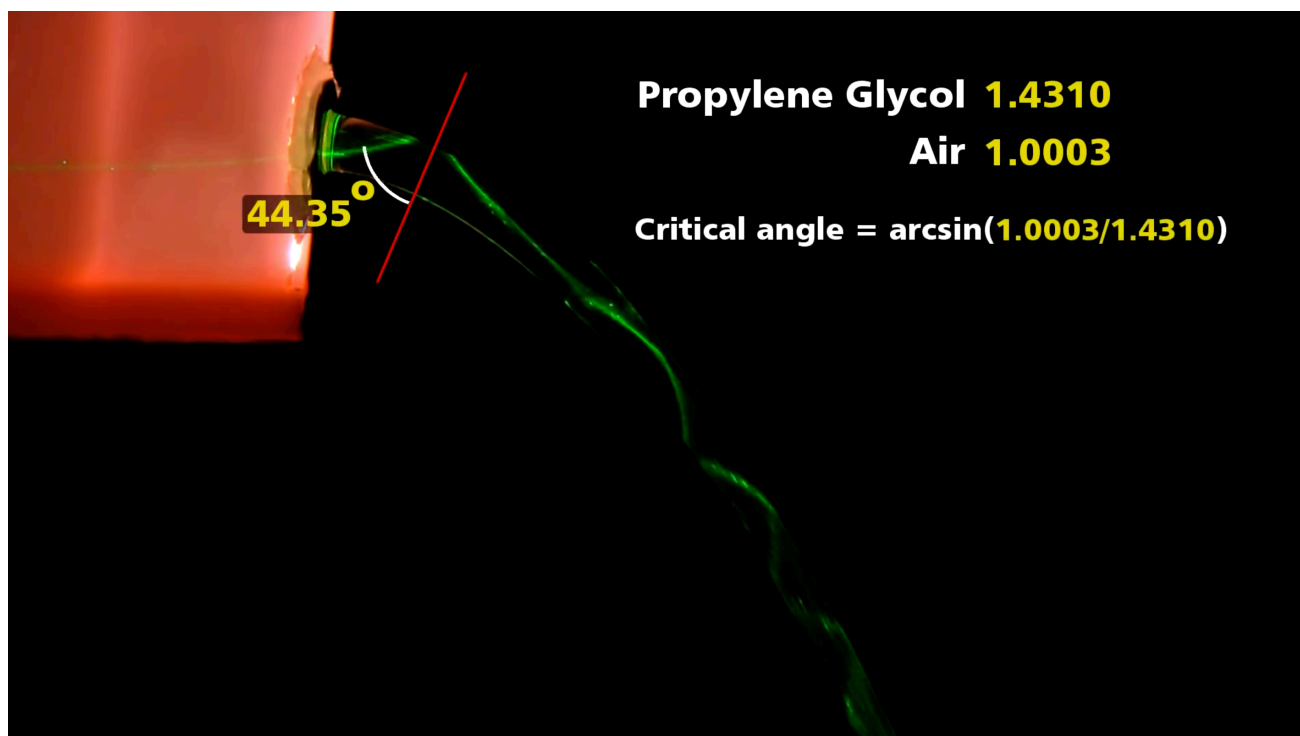


図 19 水中を導波する光の様子[18]

図 20 はスラブ導波路中を伝搬する光の様子を示す．導波路内を光が伝搬する際には，特定の角度で反射しながら進む光のみが伝搬する．この時，スラブ導波路内における光の伝搬定数 β は実効屈折率 n_{eff} を用いて

$$\beta = k_0 n_{eff} = k_0 n \sin \theta = k_0 n_2 \sin[\theta(m)] \quad (1)$$

で表される．すなわち，伝搬定数を満たす条件の波長の光が導波することを示す．

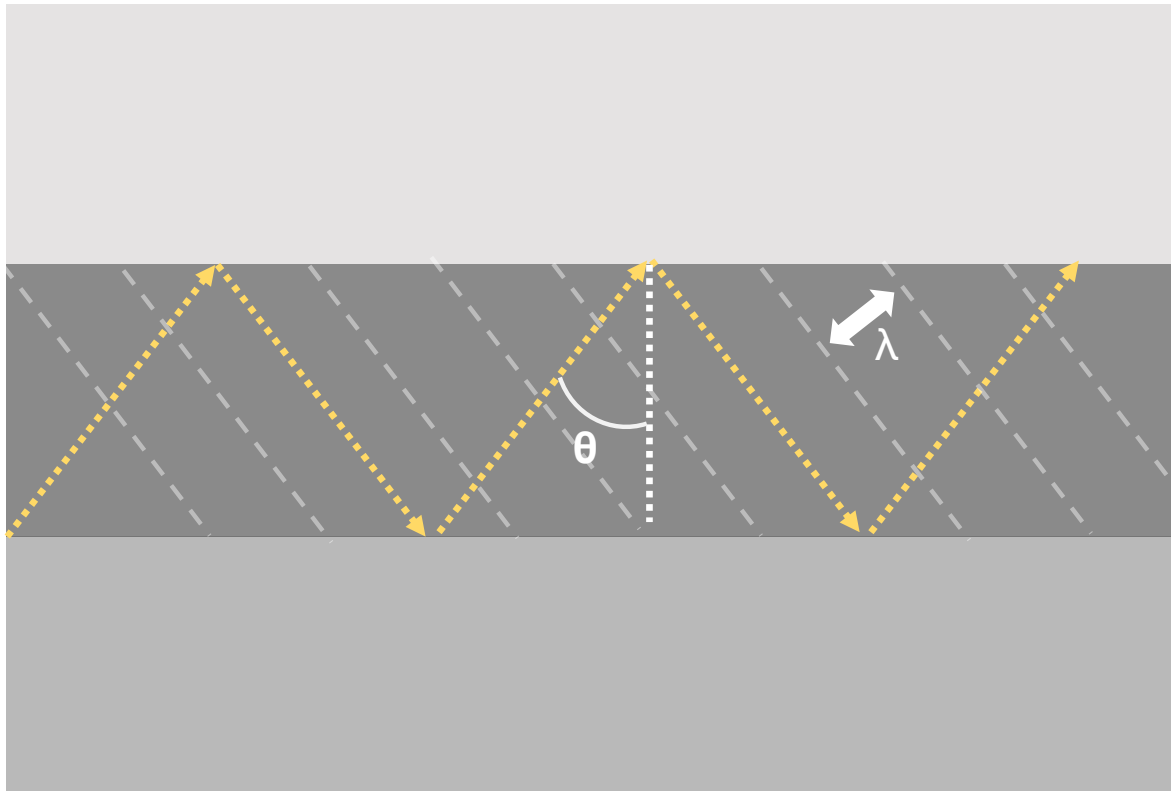


図 20 スラブ導波路中を伝搬する光の様子

次いで、最後の構成要素である回折現象について述べる．図 21 は回折格子に光を入射した際における反射および透過回折光の概念図を示す．回折光は大きく分けて回折格子より上部のエリアに位置する反射回折光および、下部に位置する透過回折光の 2 種類に分別される．

反射領域における回折光は以下の式を満たす形で与えられる．

$$n_{ref} \sin[\theta(m)] = n_{inc} \sin \theta_{inc} - m \frac{\lambda_0}{\Lambda} \sin \phi \quad (2)$$

他方で、透過領域における回折光は

$$n_{trn} \sin[\theta(m)] = n_{inc} \sin \theta_{inc} - m \frac{\lambda_0}{\Lambda} \sin \phi \quad (3)$$

で表される．双方の式はともによく似ており、違いはあくまで各領域における屈折率の違いである．回折光の方向は主に波長およびグレーティングの形状に大きく依存する．注意すべき事項としては、あくまで、上記の回折方程式は回折光の方向を表すだけで回折光強度を示すものではない．

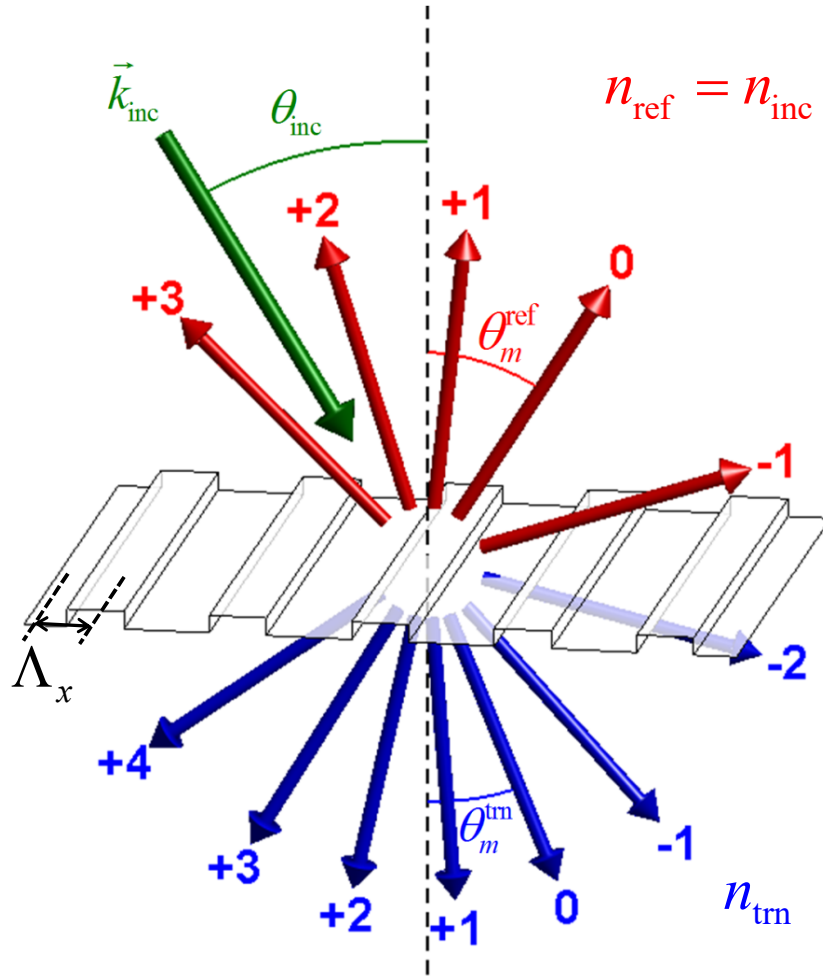


図 21 回折格子に光を入射した際における反射/透過回折光 [19]

最後に図 22 で示すようなスラブ導波路上にグレーティングを有する構造について考える．このような構造に白色光を入射すると以下の流れに従って回折光が様々な現象を引き起こす．具体的には①スラブ導波路へと入射した白色光が，②グレーティングによって波長毎に様々な角度で回折した結果，大多数の波長の光は③構造外へと透過していく．その一方で，④偶然，スラブ導波路を伝搬する条件に合致した波長の光は導波モードとなりスラブ導波路を伝搬する現象が生じる．

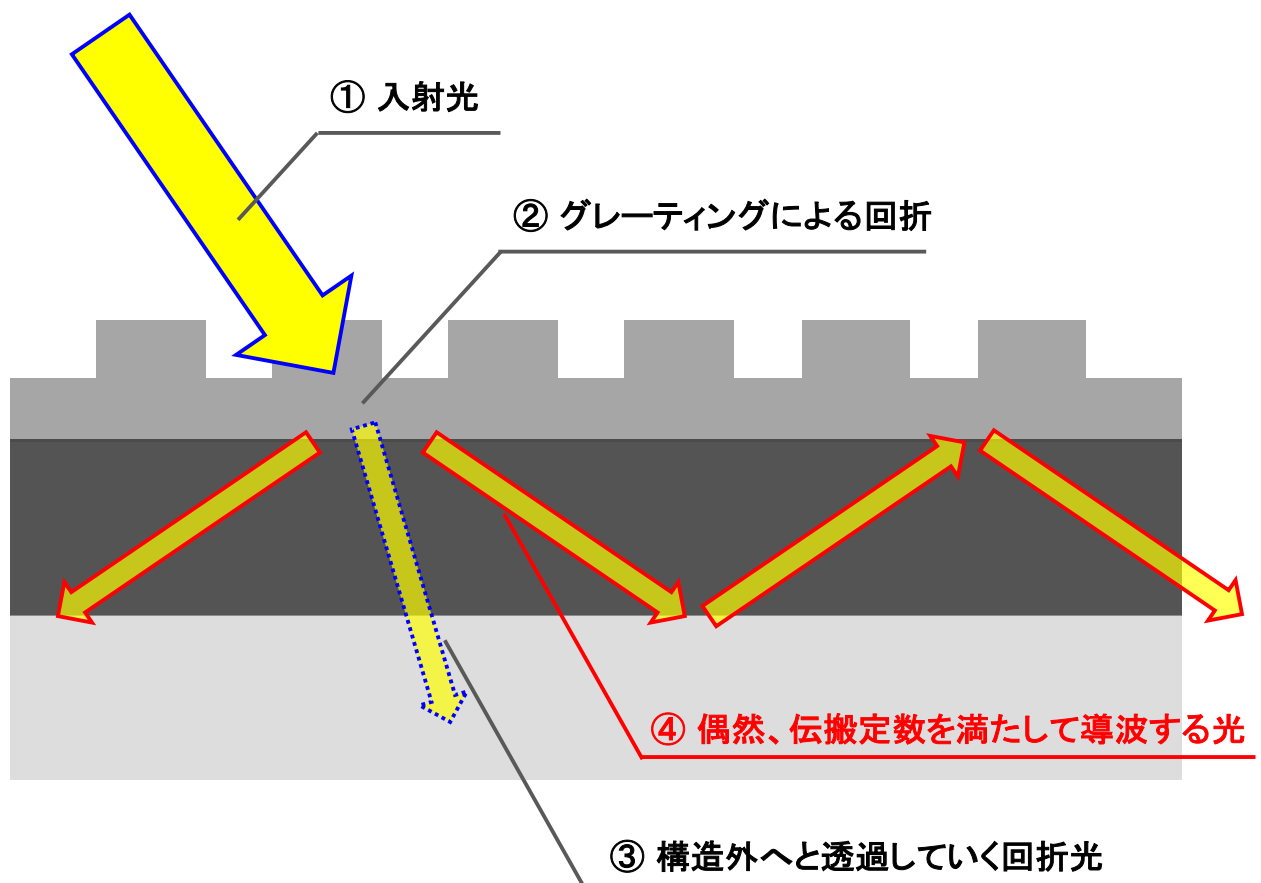


図 22 スラブ導波路上に設けられたグレーティングの影響

上記の状況について、図 23 に示すように光のふるまいは(1)非共鳴状態、(2)共鳴状態の 2 種類の観点で現象が分けられる。非共鳴状態においては、入射光の大多数は透過および表面からバックグラウンドノイズとして一部反射するなどの現象が生じる。これに対して共鳴状態と呼ぶ状態では、第一に回折した後の入射光について一部の波長のみが導波される。導波された光はゆるやかに導波層から外へと漏れ出す(“Leaked”)。この時に漏れだしている光は入射光と干渉することで非常にユニークな光学フィルタとしての機能を発現する。これを導波モード共鳴効果(Guided Mode Resonance)と呼ぶ。

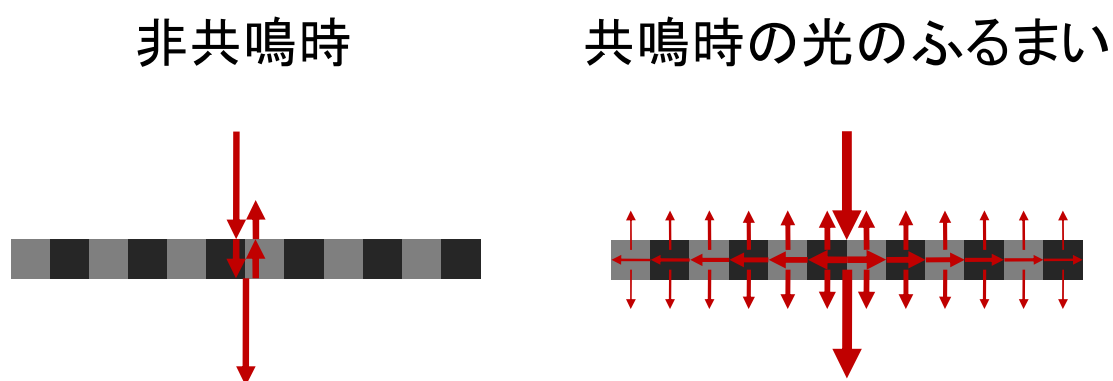


図 23 共鳴状態の有無による光のふるまい

図 24 は図 22 で示した構造に単一の波長を入射した時のシミュレーション結果を示す。左側は非共鳴波長の光を GMR フィルタに入射した時の様子を示す。GMR フィルタに入射した光は回折格子の構造によって回折するが、回折後の光は透過するのみである。これに対して右図は、共鳴波長の光を構造に入射した時の様子を示す。図中に示されるように導波層を伝搬する様子が示されている。ここで導波している波長の光は入射光と結合することで光学フィルタとしての機能を発現する。この現象は複数の波長を有する光を照射しても同様に発現する。

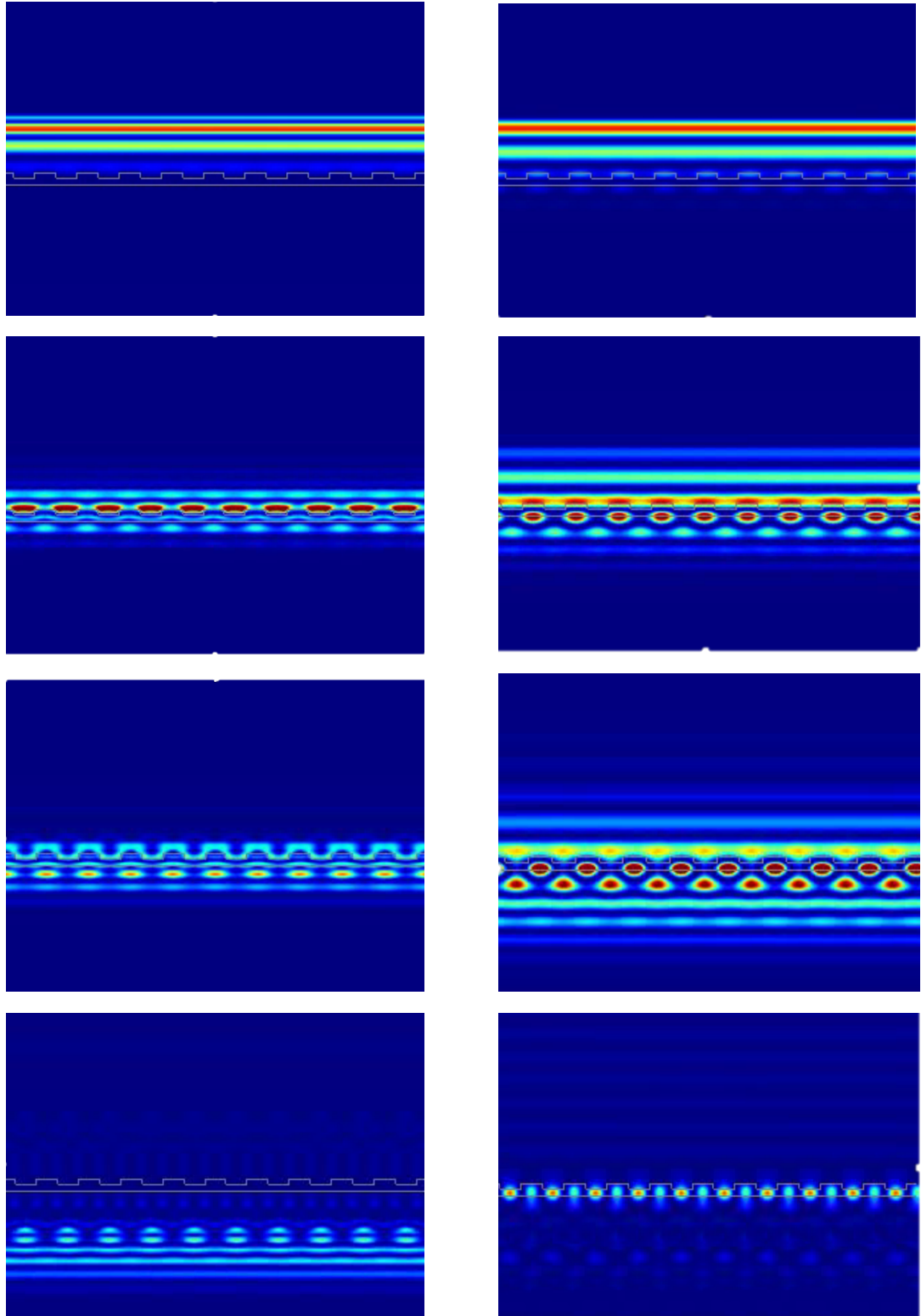


図 24 シミュレーションによる導波モード時の光のふるまい：上から下の画像になるにつれて時間が進んでいる様子を示す． 左図：非共鳴波長の光の照射，右図：共鳴波長の光が導波される様子を示す．

上記の現象は、これまでに示した数式の組み合わせからも示される事が知られている．式(1)及び式(3)を上図の状況に照らし合わせると、導波エリアの実行屈折率 n_{eff} は

$$n_{eff} = n_1 \sin \theta_{inc} - m \frac{\lambda_0}{\Lambda} \sin \phi \quad (4)$$

の式で求められる．ここで、改めてスラブ導波路中を光が伝送するためには(=導波モード)光ファイバと同様に光が導波する領域の屈折率が上下の材質よりも高い必要がある．数式上での n_{eff} の扱いは原理的に導波領域の材質を超えることはないことを式で示すと

$$\max[n_1, n_3] \leq n_{eff} < n_2 \quad (5)$$

となる．上式に(4)式を代入すると

$$\max[n_1, n_3] \leq \left| n_1 \sin \theta_{inc} - m \frac{\lambda_0}{\Lambda} \sin \phi \right| < n_2 \quad (6)$$

という式が得られる．この式を満たす形で導波モード共鳴効果における共鳴波長の範囲が求められる．

ここで、実際の GMR フィルターの構造に着目する．図 25 は GMR フィルターの一般的な構造を示す．先述の通り GMR フィルタは 3 つの領域で分けて考える必要がある一方で、実際には $\epsilon_1, \epsilon_2, \epsilon_3$ の 3 種類の異なる誘電率の材質で構成される．従来まで、屈折率で表記していたが、ここでは誘電率 ϵ を用いて材質の物性を表記する．

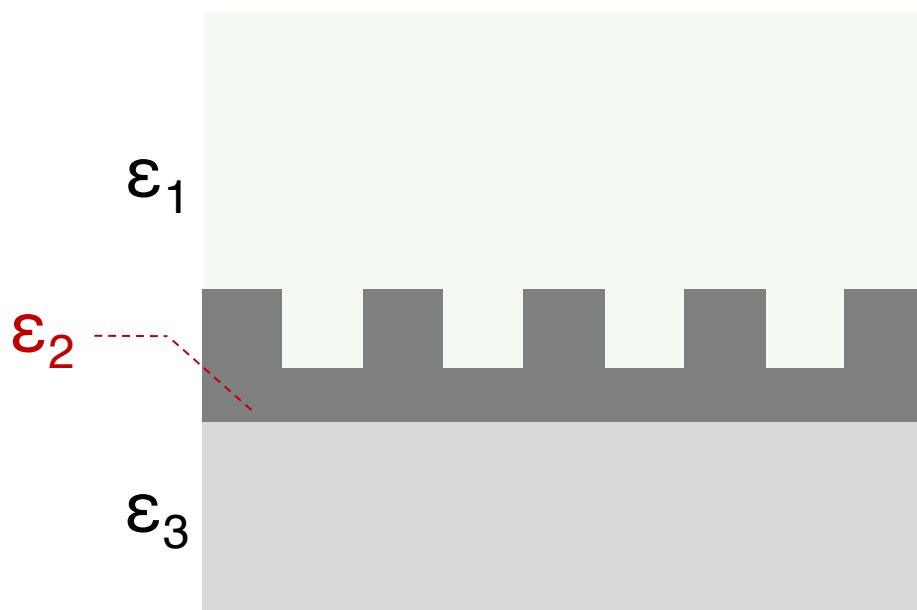


図 25 GMR フィルターの一般的な構造

回折格子の領域に着目すると、回折格子を構成する材質 ϵ_2 と ϵ_1 が領域内にそれぞれ存在することになる．これらは、計算を簡略化するために図 26 に示す構造で近似される．この時、回折格子領域のエリアは平均値の結果として相対的に誘電率が高く表れる ϵ_H と低く現れる ϵ_L が周期構造と表される．そのため、回折格子領域のエリアにおける誘電率が位置 x によって変化するため $\epsilon_2(x)$ と表記される．

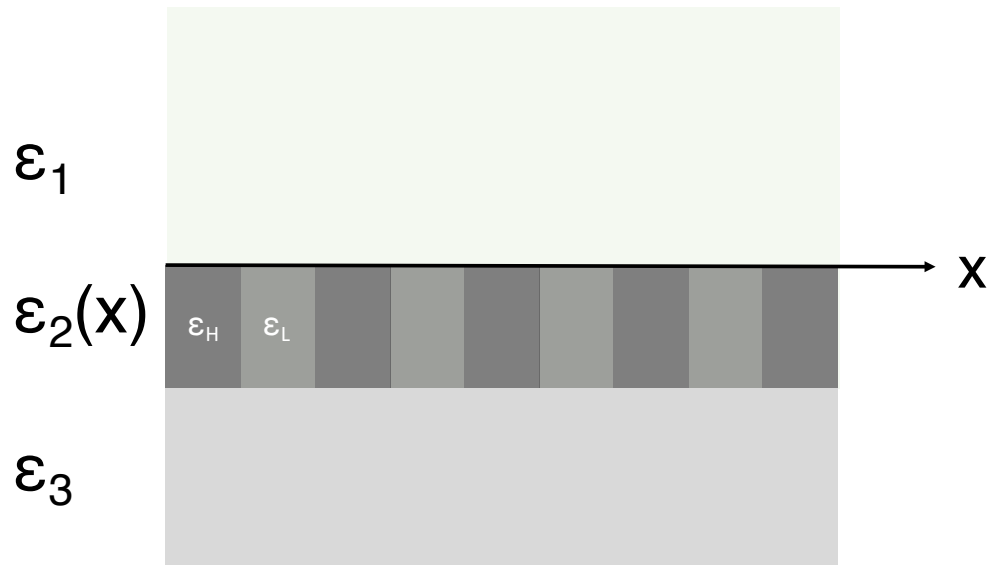


図 26 GMR フィルター構造の近似

GMR フィルターの数値計算を行う上で，回折格子領域の誘電率は平均誘電率(Average relative permittivity) : ε_g として扱われる．そのため，数値計算を行う上での近似構造は図 27 に示すようになる．

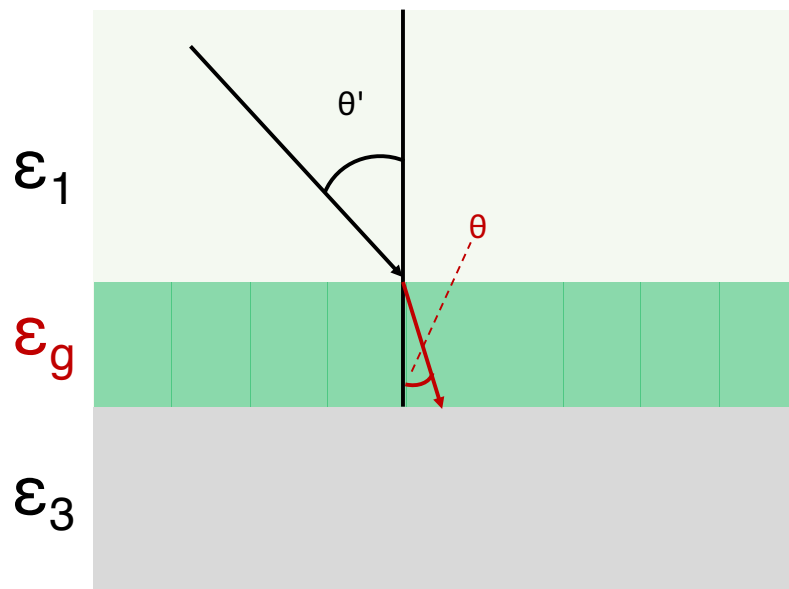


図 27 平均誘電率を用いた GMR フィルタのスラブ導波路としての等価構造

この時，スラブ導波路として扱う際の伝搬定数は

$$\beta = \beta_i = k \left(\sqrt{\varepsilon_g \sin \theta} - i\lambda/\Lambda \right)$$

で表される．

図 27 の構造において **TE** 偏光における固有値方程式は以下の式で表される[14]．

$$\tan(\kappa_i d) = \frac{\kappa_i(\gamma_i + \delta_i)}{\kappa_i^2 - \gamma_i \delta_i}$$

同様に **TM** 偏光における固有値方程式は以下の式で表される．

$$\tan(\kappa_i d) = \frac{\varepsilon_g \kappa_i (\varepsilon_3 \gamma_i + \varepsilon_1 \delta_i)}{\varepsilon_1 \varepsilon_3 \kappa_i^2 - \varepsilon_g^2 \gamma_i \delta_i}$$

ここで $\kappa_i = (\varepsilon_g k^2 - \beta_i^2)^{1/2}$, $\gamma_i = (\beta_i^2 - \varepsilon_1 k^2)^{1/2}$, $\delta_i = (\beta_i^2 - \varepsilon_3 k^2)^{1/2}$ と定義される．これらの方程式を満たす解を数値計算で求める事によって，**TE** および **TM** モードにおけるそれぞれの共鳴波長が求められる．

3.4. 導波モード共鳴効果フィルタの応用事例

3.4.1. 構造制御に基づくカラーフィルタへの応用

導波モード共鳴効果を用いた応用事例の中でも、最も代表的なものとしてカラーフィルタが挙げられる。図 28 はポリマーベースの導波モード共鳴フィルタを用いた可視光域用のカラーフィルタを示す。低屈折率($n=1.4$)のポリマー上に高屈折率材料のポリマー($n=1.7$)を 1 次元周期構造として配置することでフィルタを形成している[20]。周期構造を形成する手法として、材料表面上に対して周期構造のパターニングを行った後にドライエッチングを行う手法が一般的である。この時、パターニング手法は(1)電子線露光や干渉光を用いた光学的手法、および(2)マスターモールドを作製した後に、モールドの形状をポリマーに力学的に転写するナノインプリンティング手法の 2 種類に大別される。ここでは、周期幅 Λ が 300nm から 600nm までそれぞれ異なる Si モールドを用いて GMR フィルタを作製している。図 28 で示されるように GMR フィルタは、周期幅 Λ に従って反射波長を制御することが可能であり、実際に三原色に相当するカラーフィルタが作製されている。

導波モード共鳴効果を用いたカラーフィルタが着目されている最大の理由は、高い波長選択性に加えて共鳴条件に相当する波長において反射率 1 に相当する高効率な反射特性[21-22]を有することであり、理論・実験の双方の観点から実現可能であることが知られている。そのため、光学ディスプレイ[23],イメージセンサ[24-25],などの多岐に渡る光学デバイスにおいて研究報告がなされている。

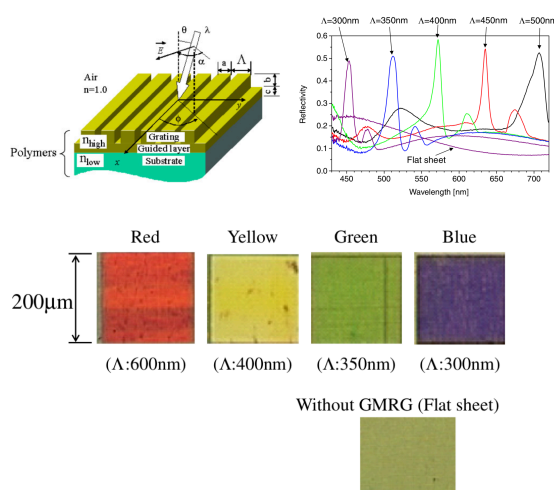


図 28 GMR フィルタの周期構造の制御によるカラーフィルタ [20]

導波モード共鳴効果を用いたカラーフィルタは高い波長選択性および反射率を有する一方で、可変波長フィルタとして用いる研究も着目されている。図 29 は GMR フィルタに入射する光の角度を調整することで R, G, B の三原色を取り出している例を示す[26]。ここで重要な観点としては、従って、フィルタの角度を機械的に制御することで単一の GMR フィルタから複数の波長の光を取り出す事が可能であるということである。

しかしながら、入射角を調整する場合、実際の実験セットアップでは、GMR 装置と同期して補償器ミラーを使用して光路を調整している。これによって光の入射角全てにわたって一貫した検出が可能になる。しかし、実際には、補償ミラーを現実の装置に組み込むことは非常に困難である。これに対処するため、Abdulhalim[27]らはネマチック液晶を用いた可変波長カラーフィルタを報告している。他にも、MEMS(Microelectromechanical system)を用いて GMR の構造パラメータを直接変更することで反射波長を制御する手法も提案されている[28-30]。

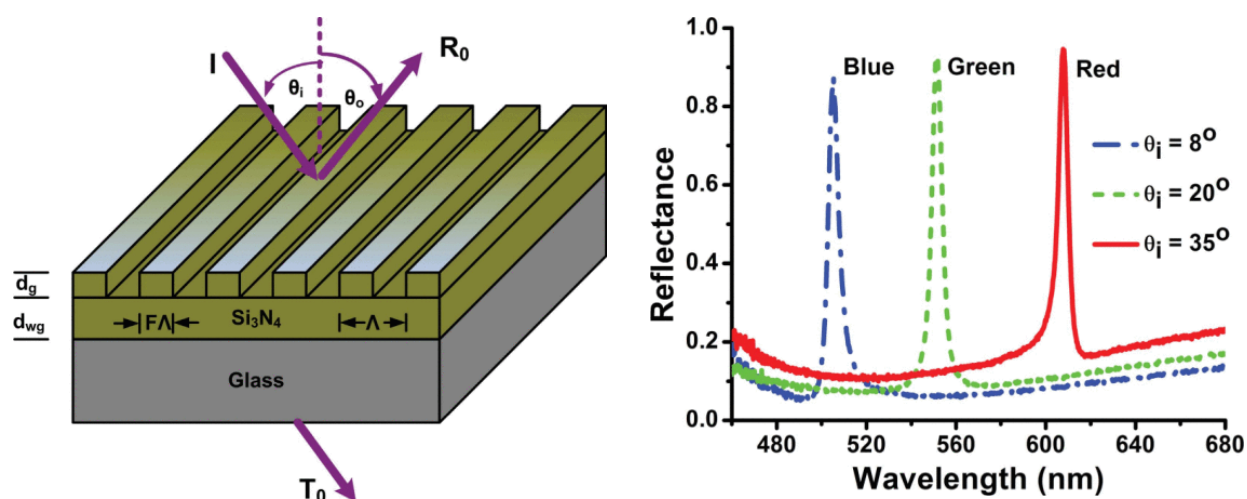


図 29 入射角の制御による反射波長の制御[26]

3.4.2. 機械的制御手法に基づく GMR フィルタの応用

先の例では入射角を制御する事で反射波長を制御する例を述べたが、機械的な手法を用いてより直接的に反射波長を制御する手法も提案されている[31]．図 30 は MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)を用いた光スイッチング素子の例を示す．図中の PC slab(可動フォトニック結晶スラブ)は，周囲に配置された小型のアクチュエーターを制御することで，基板との平行を保ちながら上下移動することが出来る．基板と PC Slab 間のギャップが 400 nm 以下になると特定の波長(1545 nm)の光が基板表面へと逃げることで反射率が急速に低下する．このように，反射波長強度を MEMS 技術を用いて制御することにより光スイッチング素子として機能させることが可能となる．

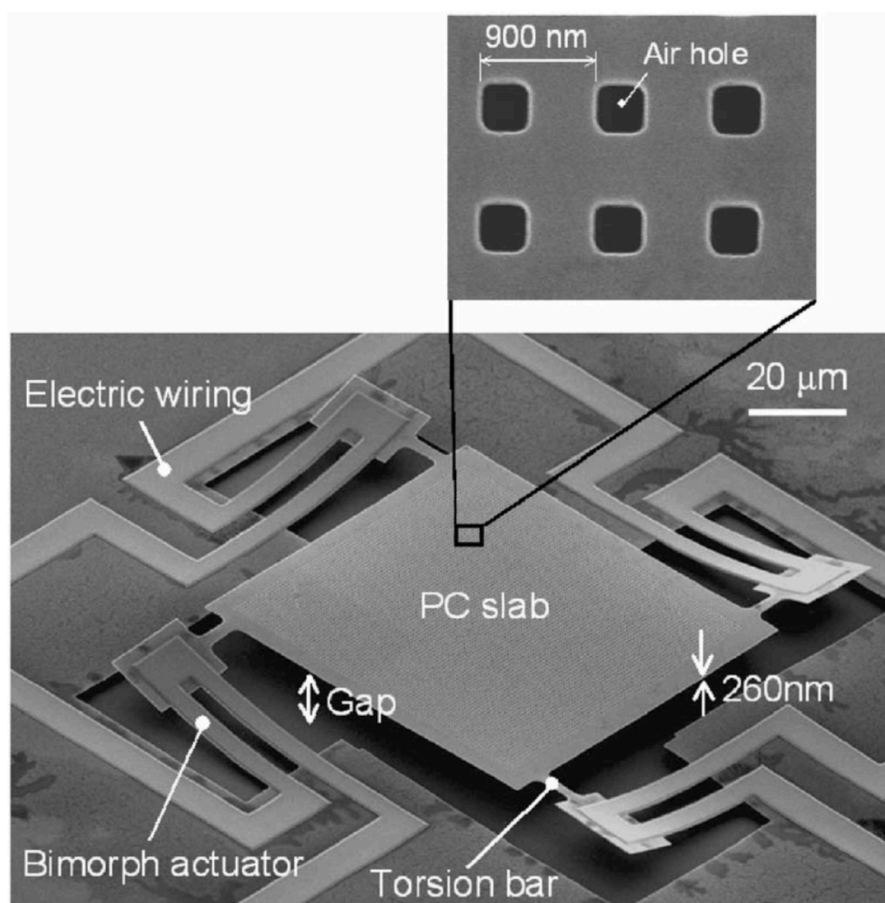


図 30 MEMS を用いた反射効率制御素子の作製 [31]

図 31 は流路内の圧力変化を GMR フィルタから得られる反射波長を用いて検出する様子を示す．GMR フィルタそのものの構造が機械的に制御されることで，共鳴条件が大幅に変化する．流路内の圧力が高くなると，素子自体が膨らむため GMR フィルタの構造が直接

的に変化する．この時に生じる見かけの周期幅の変化によって反射波長が変化する．特に Lab on a chip と呼ばれる微小空間内で生体・化学反応の発生・検出を行うような場面において直接的に圧力をモニタリングする手法の一つとして提案されている．このように，機械的な変化に対するセンシング手法としても GMR フィルタを用いることは可能である．

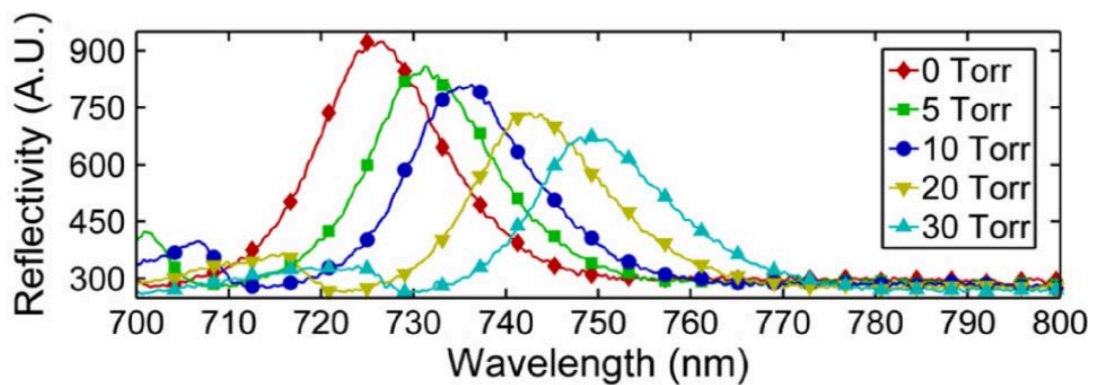
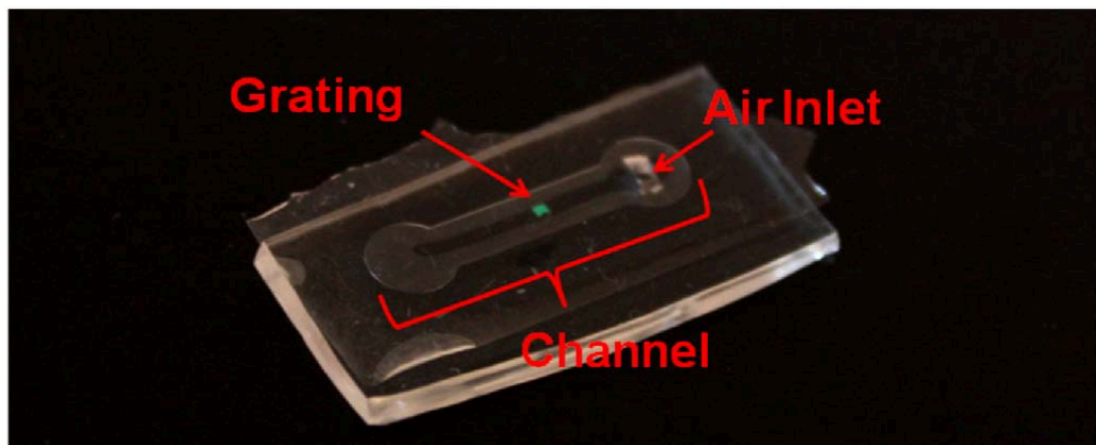


図 31 圧力変化を用いた反射波長の制御[32]

3.4.3. 導波モード共鳴効果を用いたラベルフリーバイオセンサ

GMR フィルタは、ラベルフリーバイオセンサとして用いる事が可能である[33-35]. 図 32 は GMR フィルタを用いた生体物質の検出例を示す. 図 32 (b)に示すように, 生体物質が付着していない状態を基準状態(Baseline)とすると, 標的物質が付着した状態(After analyte binds)に反射波長が変化する現象が生じる[36]. GMR フィルタ上に白色光を入射した際に反射する波長は共鳴条件に大きく依存する.

GMR フィルタの共鳴条件を大きく左右する要素として平均誘電率 ϵ_g が挙げられる. 生体物質の屈折率(≒誘電率)に着目すると, $n=1.45$ 付近であるため空気($n=1.0$)に比べて遥かに大きい. そのため, フィルタ表面上に生体物質の吸着する前後では表面上の屈折率が大きく変化する. 従って, 生体物質の付着に伴う平均誘電率 ϵ_g の増大により反射波長が変化する現象が生じる. ϵ_g の値は原理的に増大するのみなので, 生体物質の付着に伴う共鳴波長の変化は原理的に高波長側にシフトするのみである. これを赤外シフト(Red shift)と呼ぶ.

GMR フィルタ表面上に抗体のような抗原を捕獲する物質を固定化した時に, 抗原を含む溶液を滴下すると抗原の濃度に応じてフィルタ表面上の抗体に一定量の抗原が固定化される. この時, 固定化される抗原の量が異なると必然的に ϵ_g の値も異なってくる. 従って, フィルタ上に固定化された標的物質の量に応じて反射波長は変化するため定量検出手法として機能する. そのため, 図 32 に示すように抗原濃度の異なる溶液をフィルタ上に反応させると, 抗原の濃度に応じた反射波長シフトが生じる.

このように, GMR フィルタを用いたバイオセンサは(1)ラベルフリー, (2)定量検出が可能である事に加えて(3)リアルタイムで検出することが可能であるという特徴を有している. 光学的な手法を用いたバイオセンシング手法は多岐にわたり提案されているが, その中でも GMR フィルタを用いたバイオセンサは表面プラズモン共鳴を用いたセンシング手法と対比されることが多い. 表面プラズモン共鳴を用いた場合, 光を表面波に結合するためのプリズムやレーザ光源を必要とする. これに対して GMR フィルタは, 光源として白熱ランプや発光ダイオードなどの安価な光源を用いることが可能であることに加えて, プリズムのような位整合素子を必要としないため全体の系を小さく設計する事が可能であるという利点を有する.

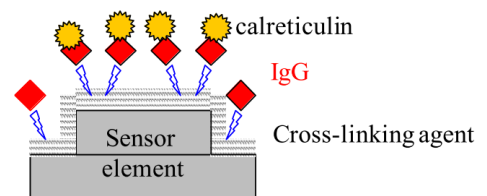
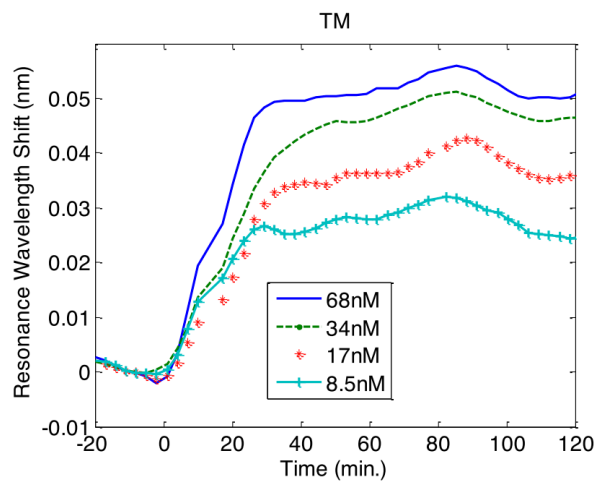
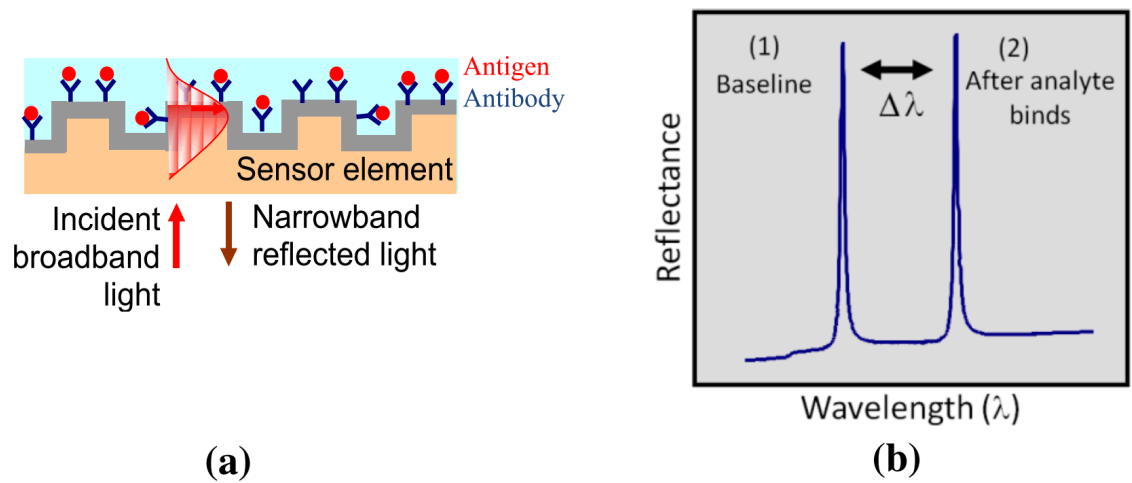


図 32 GMR フィルタを用いたバイオセンシング [36]

3.5. GMR フィルタを用いた携帯型医療診断システムの提案

定量検出が可能な携帯型医療診断システムを実現するにあたり、GMR フィルタを含む全体のシステムについて述べる。図 33 は GMR フィルタを用いた携帯型医療診断システムの構成図を示す。GMR フィルタ表面上に入射された白色光は、これまでに述べたようにフィルタ表面の状態に応じて特定の波長の光のみが反射する。この反射光を信号光とする。反射光は最終的にスマートフォンのカメラ上で電気信号として検出することで解析が可能となる。

生体物質の定量検出を行う流れは従来の手法と同様である。すなわち、検体の濃度が低濃度の場合、図 34 (a)のように極微量の反射波長変化が得られる。これに対して、検体の濃度が高濃度となった場合、図 34 (b)に示すように大幅な反射波長シフトが生じる。従って、(1)定量検出素子としての GMR フィルタと(2)検出器としてのスマートフォンをそれぞれ組み合わせることで、携帯型の機器での定量検出が可能となる。

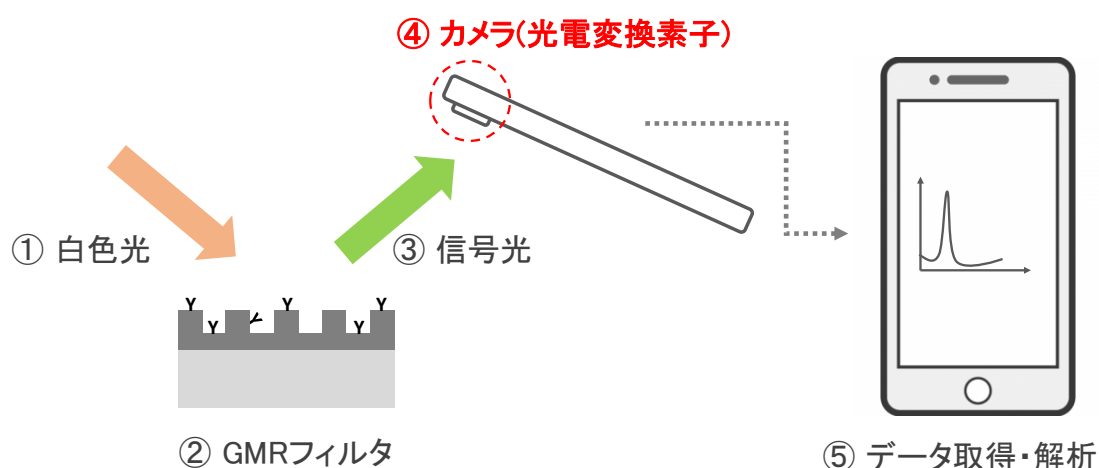


図 33 GMR フィルタを用いた携帯型医療診断システムの構成図

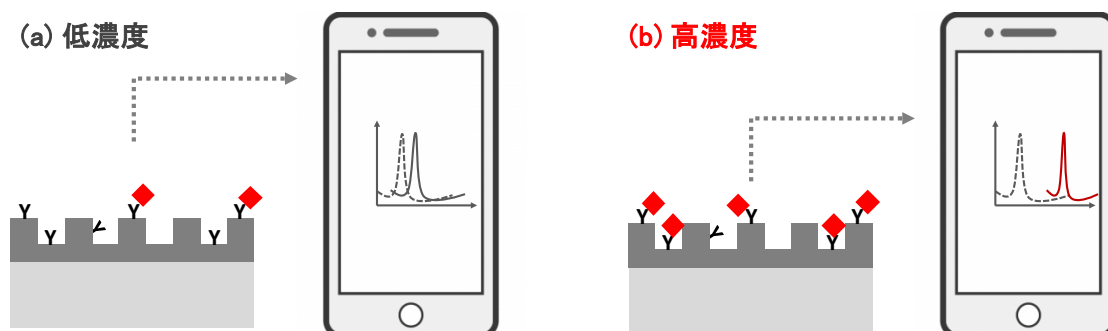


図 34 携帯型医療診断システムにおける定量検出

3.6. サマリー

携帯型医療診断システムの実現において、携帯型である事を前提とした定量検出手法が求められる。本章では、本研究で着目している導波モード共鳴効果について歴史概観から原理、そして応用事例に至るまでの一通りの事項を紹介した。その中で、**GMR** フィルタを用いたバイオセンシング手法とスマートフォン上のカメラを組み合わせる手法を紹介した。ここで述べた手法が本研究の目的として掲げた携帯型の定量検出手法と成りうると考えられる。

3.7. 参考文献

- [1] "天体分光学の発展 - 分光学のはじまり", http://www.wakayama-u.ac.jp/~atomita/class/CosmicSpectra/spectrum/history/sp_h.htm
- [2] D. Rittenhouse, "An optical problem, proposed by Mr. Hopkinson, and solved by Mr. Rittenhouse," Transactions of the American Philosophical Society 2, 201–6 (1786).
- [3] "分光化学分析の発展", http://kccn.konan-u.ac.jp/chemistry/ia/contents_05/01.html
- [4] R. W. Wood, "On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum," Proceedings of the Physical Society of London 18, 269–75 (1902).
- [5] L. Rayleigh, "On the dynamical theory of gratings," Proceedings of the Royal Society of London 79, 399–416 (1907).
- [6] U. Fano, "The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves)," Journal of the Optical Society of America 31, 213–22 (1941).
- [7] C. H. Palmer, "Diffraction grating anomalies. II. coarse gratings," Journal of the Optical Society of America 46, 50–53 (1956).
- [8] Hessel and A. A. Oliner, "A new theory of Wood's anomalies on optical gratings," Applied Optics 4, 1275–97 (1965).
- [9] M. Neviere, P. Vincent, R. Petit, and M. Cadilhac, "Systematic study of resonances of holographic thin film couplers," Optics Communications 9, 48–53 (1973).
- [10] L. Mashev and E. Popov, "Zero order anomaly of dielectric coated gratings," Optics Communications 55, 377–80 (1985).
- [11] M. Gale, K. Knop, and R. Morf, "Zero-order diffractive microstructures for security applications," Proceedings of SPIE, Optical Security and Anticounterfeiting Systems 1210, 83–89 (1990).
- [12] S. S. Wang, R. Magnusson, J. S. Bagby, and M. G. Moharam, "Guided-mode resonances in planar dielectric-layer diffraction gratings," Journal of the Optical Society of America A 7, 1470–74 (1990).
- [13] R. Magnusson and S. S. Wang, "New principle for optical filters," Applied Physics Letters 61, 1022–24 (1992).
- [14]

- [15]S. S. Wang and R. Magnusson, "Theory and applications of guided- mode resonance filters," *Applied Optics* 32, 2606–13 (1993).
- [16]R. Magnusson, S. S. Wang, T. D. Black, and A. Sohn, "Resonance properties of dielectric waveguide gratings: theory and experiments at 4-18 GHz," *IEEE Transactions on Antennas and Propagation* 42, 567–69 (1994).
- [17]S. S. Wang and R. Magnusson, "Design of waveguide-grating filters with symmetrical line shapes and low sidebands." *Optics Letters* 19, 919–21 (1994).
- [18]R. Magnusson and S. S. Wang, "Transmission bandpass guided-mode resonance filters," *Applied Optics* 34, 8106–9 (1995).
- [19]"Fiber optic cables: How they work", https://www.youtube.com/watch?v=0MwMkBET_5I
- [20]"21ST CENTURY ELECTROMAGNETICS , Lecture 11",
<http://emlab.utep.edu/ee5390em21.htm>
- [21]Kanamori, Yoshiaki, et al. "Design and fabrication of structural color filters with polymer-based guided-mode resonant gratings by nanoimprint lithography." *Japanese Journal of Applied Physics* 48.6S, (2009).
- [22]M. J. Uddin and R. Magnusson, *Opt. Express* 21(10), 12495 (2013).
- [23]M. J. Uddin and R. Magnusson, *IEEE Photonics Technol. Lett.* 24, 17, 1552 (2012).
- [24]R. W. Sabnis, *Displays* 20, 119 (1999).
- [25]Q. Chen, X. Hu, L. Wen, Y. Yu, and D. R. Cumming, *Small* 1 (2016).
- [26]R. Hadar, G. Vincent, S. Collin, N. Bardou, N. Gu ´rincieu, J. Deschamps, and J. L. Pelouard, *Appl. Phys. Lett.* 96(22), 3, (2010).
- [27]Uddin, Mohammad Jalal, and Robert Magnusson. "Efficient guided-mode-resonant tunable color filters." *IEEE Photonics Technology Letters* 24.17, 1552-1554, (2012).
- [28]Abdulhalim, *Chinese Opt. Lett.* 7, 667 (2009).
- [29]W. Suh, M. F. Yanik, O. Solgaard, and S. Fan, *Appl. Phys. Lett.* 82(13), 1999 (2003).
- [30]Y. Kanamori, T. Kitani, and K. Hane, *Appl. Phys. Lett.* 90(3), 2007 (2007).
- [31]R. Magnusson and Y. Ding, *IEEE Photonics Technol. Lett.* 18(14), 1479 (2006).
- [32]Kanamori, Yoshiaki, Takashi Kitani, and Kazuhiro Hane. "Control of guided resonance in a

- photonic crystal slab using microelectromechanical actuators." *Applied physics letters* 90.3 , 031911, (2007).
- [33]Foland, Steven, et al. "One-dimensional nanograting-based guided-mode resonance pressure sensor." *Journal of microelectromechanical systems* 21.5, 1117-1123, (2012).
- [34]D. Wawro, S. Tibuleac, R. Magnusson, and H. Liu, *Proc. SPIE* 3911, 86 (2000).
- [35]X. Wei and S. M. Weiss, *Opt. Express* 19(12), 11330 (2011).
- [36]J. H. Schmid, W. Sinclair, J. García, S. Janz, J. Lapointe, D. Poitras, Y. Li, T. Mischki, P. Cheben, A. Delage, A. Densmore, P. Waldron, and D.-X. Xu, *Opt. Express* 17(20), 18371 (2009).
- [37]Magnusson, Robert, et al. "Resonant photonic biosensors with polarization-based multiparametric discrimination in each channel." *Sensors* 11.2, 1476-1488, (2011).

4. 導波モード共鳴効果を用いた可変波長フィルタの作製

4.1. はじめに

第3章では携帯型の定量検出手法の実現方法の一つとして、GMR フィルタから得られる信号光をスマートフォン上のカメラで検出する手法を示した。スマートフォン上のカメラで信号光を検出するためには、GMR フィルタを設計するうえで制約条件が現れる。それは、GMR フィルタから得られる信号光、すなわち共鳴波長が可視光領域の範囲であるという点である。これは、スマートフォン上のカメラは人間の目の感度特性を模倣して設計されていることに起因する。具体的には、スマートフォンのカメラレンズを通して入射した光は光電変換素子(CCD/CMOS イメージセンサ)によって電気信号へと変換される。光電変換素子の直前に位置する光学フィルタは主に R,G,B の三原色で構成されている。言い換えると、このいずれかのカラーフィルタを透過する波長の光を信号光として扱う必要がある。その一方で、GMR フィルタを設計するうえで現実的な課題が生じる。それは、各カラーフィルタの透過する波長領域の重なる領域に共鳴波長が現れないように GMR フィルタを設計する必要があることである。Dustin らの報告では、スマートフォンの CMOS イメージセンサ上で反射波長シフトを測定する場合、400～650nm の範囲内では信号光の検出が可能であると述べた上で、実際には 550～580nm の範囲に共鳴波長を有する GMR フィルタを用いる事が望ましいと述べている[1]。しかし、現実的には材料やプロセスの制約条件、加工過程で構造誤差が生じるなど、設計と実装の間において現実的な課題を有している。加えて、無数に存在するスマートフォンの機種毎に合わせてセンサを設計しなおす事も現実的な対応手法とはいえず、GMR フィルタにおける可変波長方式そのものを新たに提案することが求められる。

本章では特殊な追加加工・プロセスを必要としない GMR フィルタの共鳴波長を制御する手法を提案する。ここでは実際に①GMR フィルタの設計・作製を行うとともに②基礎的な光学的特性を評価する。最終的に③提案する可変波長フィルタの原理検証の結果についてそれぞれ述べる。

4.2. 概観

GMR フィルタの光学特性を測定する実験は一般的にクラシカルマウント(classical mounting)と呼ばれる系で行われる．クラシカルマウントは，入射光の入射面とグレーディングベクトルがそれぞれ平行な状態で測定する系である．クラシカルマウントに対して，グレーディングベクトルに対して入射面が並行でない場合の状態をコニカルマウント(conical mounting)と呼び，GMR フィルタから非偏光出力を取り出す用途において用いられている[2]．しかし，コニカルマウントに関する文献の研究報告は限られている．一例として入射面をグレーディングベクトルに対して90度回転させたフルコニカルマウントに関する研究報告がなされている[2-5]．その他にも，Szeghalm らは一般的なコニカルマウントの光学系において，2次元周期構造を有するGMR フィルタに光を入射した状態でフィルタそのものを水平回転させることで反射波長をチューニングできる事を報告した[6]．この報告では，浅いナノ周期構造を有するポリカーボネートを回転させる事で，反射効率は20%以下であるものの，150nm の範囲で反射波長を変化させる事が可能であることを示した．反射波長が変化した主な要因は，ナノ周期構造を水平回転させた事により見かけ上の周期構造が変化した事に起因しているとされている．

本研究では，上記のアプローチをさらに進めて，1次元のGMR 構造においても同様にセンサそのものを水平に回転させることで反射波長の調整が可能である事を示す(図 35)．先述の2次元ナノ周期構造とは対比的に，1次元ナノ周期構造は十分に確立された薄膜蒸着およびリソグラフィプロセスを用いて容易に製造されることに加えて，より広い波長調整範囲およびより高い反射効率をもたらす．加えて，1次元構造のGMR フィルタにおいて，回転に伴う見かけ上の周期性の変化が本質的な反射波長変化に寄与しないことを示す．反射波長のチューニングは，グレーディングから導波路へと結合された光波の伝搬定数の変化によって説明され，これがGMR 共鳴条件を変化させると考えた．上記の原理は，周期性の見かけの変化ではなく，2次元のGMR 構造における反射波長チューニングをより説明するものであると考えられる．

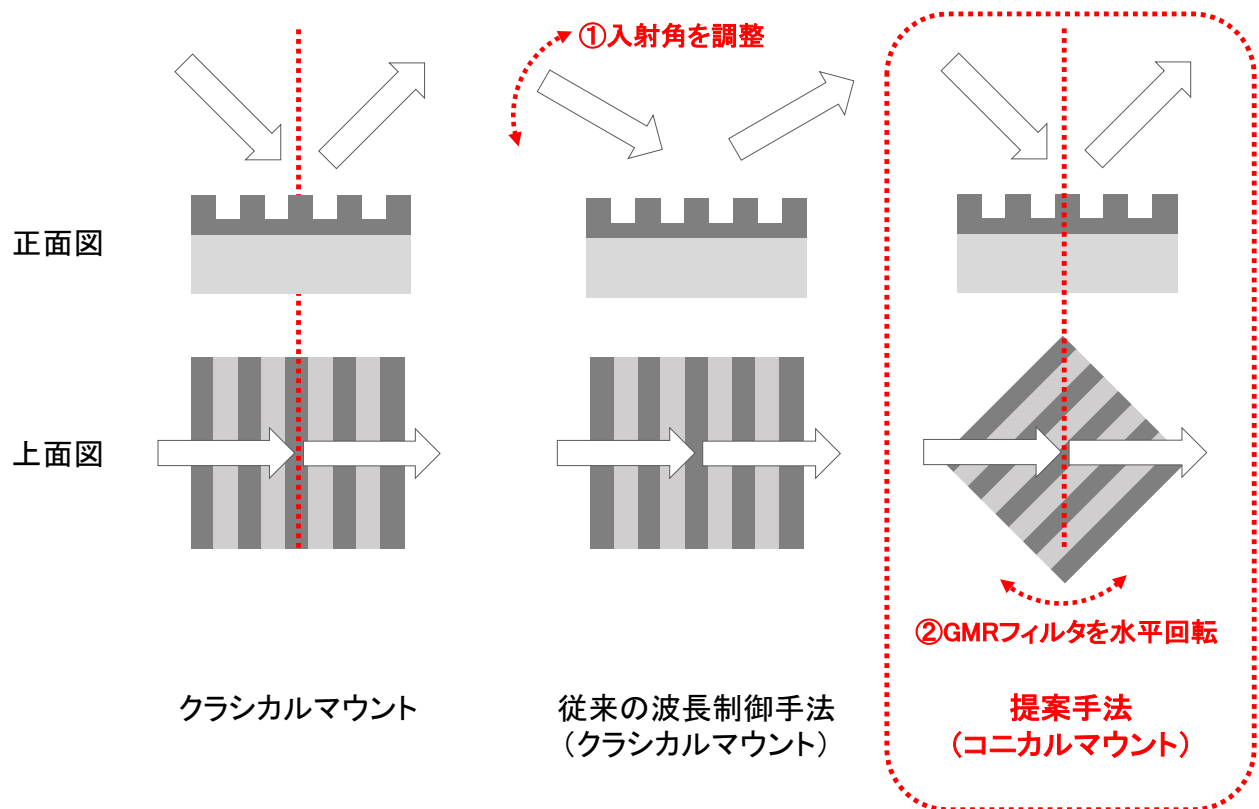


図 35 本研究で提案するコニカルマウントを用いた反射波長制御手法

4.3. 原理

GMR 構造の光学応答は、入射光の入射角に強く依存する。GMR 構造を表面法線に垂直な軸の周りに回転させると、回折光は入射面から外れて円錐の表面に位置する。これは格子による円錐回折(Conical diffraction)と呼ばれる。我々の実験では、上記で述べた円錐回折により 1 次元 GMR 構造において選択的な光学フィルタリングが生じることを示す。加えて構造は、その方位回転によって調整することができる。

コニカルマウントにおける共鳴条件や共鳴波長のチューニング、反射波長効率などの GMR フィルタの特性は後述の通りでありクラシカルマウントとは異なる事に注意する必要がある。

図 36 (a)に示すように、基板上の平面導波路上に 1 次元格子を有する GMR 構造を考える。ここで示されている 1 次元格子は、x 軸に沿ってグレーティングベクトル \mathbf{K} を有しており、その大きさは $2\pi/\Lambda$ で示される。 Λ および ϵ_{avg} はそれぞれ格子周期および格子領域の平均誘電率を示す。入射媒質領域(n_{inc})における入射波ベクトル(k_{inc})は、2 つの球座標角(θ_{inc} および ϕ_{inc})の組み合わせで表される。 θ_{inc} は入射光線と格子面に対する法線 (Z 軸) との間の角度であり、 ϕ_{inc} は X 軸に対する入射面間の角度である。方位角回転の下では、入射波ベクトル \mathbf{k}_{inc} の x, y, z 成分は、下記に示す球面座標系で表される。

$$k_{x,inc} = k_0 n_{inc} \sin \theta_{inc} \cos \phi_{inc} \quad (1a)$$

$$k_{y,inc} = k_0 n_{inc} \sin \theta_{inc} \sin \phi_{inc} \quad (1b)$$

$$k_{z,inc} = k_0 n_{inc} \cos \theta_{inc} \quad (1c)$$

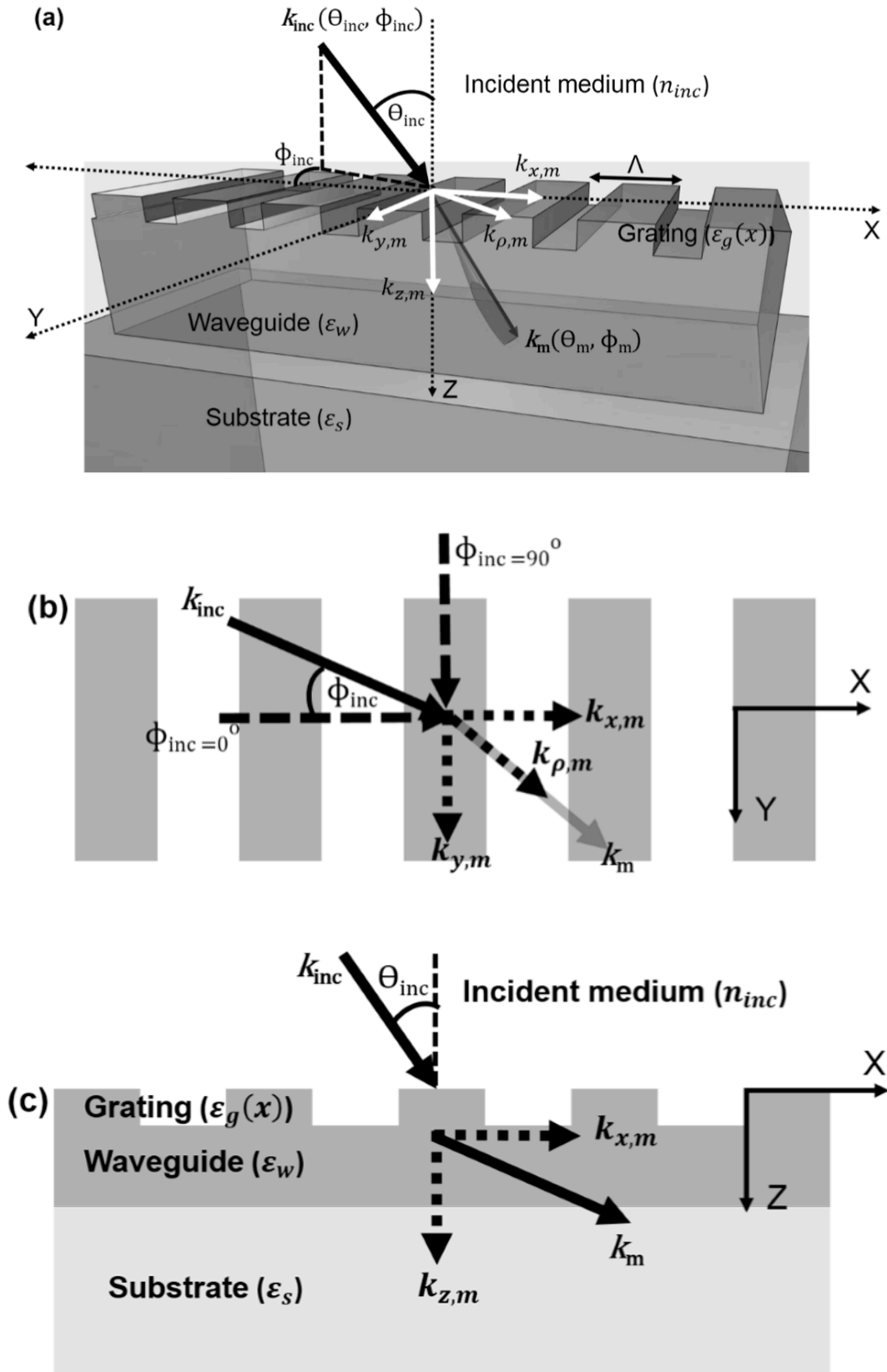


図 36 GMR 構造における円錐解説の概略図：

(a) 入射波ベクトルの回折成分の 3 次元図, (b)Top View, (c)断面図

ここで, k_0 は真空中の入射波ベクトルの大きさを示す. 回折後, 異なる回折次数は図 36 に示すように円錐の表面上にあり, それぞれ入射波ベクトルの y 成分と同等である. m 次の回折次数の x 成分は, 位相整合回折条件 $k_{x,m} = k_{x,inc} + mK$ に従って変化する. その一方で, 回折次数の y 成分は $k_{y,m} = k_{y,inc}$ であり入射波から変化しない. 従って, 図 36 (b) 中の $k_{z,m}$ および $k_{\rho,m}$ はそれぞれ, $k_{z,m} = \sqrt{k^2 - k_{\rho,m}^2}$, $k_{\rho,m} = \sqrt{k_{x,m}^2 + k_{y,m}^2}$ で示される. 共鳴条件の下において, m 次の回折光は, 回折波ベクトル k_m の縦方向成分($k_{\rho,m}$)に等しい伝搬定数(β_m)を有する導波路の導波モードとなる. 従って, $\beta_m = \sqrt{k_{x,m}^2 + k_{y,m}^2}$ となる. 式(1)中で示した $k_{x,m}$ と $k_{y,m}$ をそれぞれ用いると, 伝播定数 β_m は下記の式で与えられる.

$$\beta_m = k_0 \sqrt{(n_{inc} \sin \theta_{inc})^2 + 2n_{inc} \sin \theta_{inc} \cos \phi_{inc} m \frac{\lambda_0}{\Lambda} + m^2 \frac{\lambda_0^2}{\Lambda^2}} \quad (2)$$

上記の式は, 入射光の TE と TM の両方の偏光に対して有効である. 入射光が回折した後, スラブ導波路中において固有値方程式を満たした特定の波長の光のみが導波する.

固有値方程式のパラメータは, 伝搬定数(β_m)と GMR フィルタの各層の屈折率の関数で与えられている. したがって, 任意の入射角(θ_{inc})および方位角(ϕ_{inc})における GMR フィルタの共鳴波長は, 上記の β_m の式を組み込んだ後に固有値方程式を解くことによって求められる.

式(2)は, 導波の伝搬定数が方位角 ϕ_{inc} に依存することを示しており, 水平回転方式を用いた波長可変フィルタにおける最も基礎的な式を示す. それと同時に, GMR 構造の方位回転による反射波長の制御が原理的に可能であることを示す.

4.4. 微細加工技術を用いたセンサの設計

GMR フィルタの構造設計において、各種パラメータを決定する必要がある。光の波長程度の周期構造を解析する手法として、大きく分けて 2 つの方法が挙げられる。第一に RCWA 法(Rigorous Coupled Wave Analysis)と呼ばれるもので厳密結合波解析法などと訳されており、均一な媒質の周期構造に適している。そして、第二に FDTD 法(Finite-difference time-domain method)あるいは時間領域差分法と呼ばれる手法である。FDTD 法は複雑な溝形状や異なる媒質で構成される構造に適している。これらの方法の使い分けとして、対称とする素子構造や溝間隔が使用する電磁波の波長よりも大きい場合には RCWA 法、構造が波長と同程度である場合には FDTD 法を用いることが望ましいとされている[7]。

本研究では構造が波長と同程度であることや使用する材料の特性を踏まえた上で材料の比較検討ができるなどの理由から、FDTD 法を用いたシミュレーションによってパラメータ値を決定した。本論文では、シミュレーションソフトウェアに FDTD Solutions(Lumerical 社)を、数値計算に MATLAB をそれぞれ用いた。

図 37 および図 38 はシミュレーションで用いる構造を示す。ガラス基板表面に高屈折率材料を 500nm 周期で周期的に繰り返すように配置している。本研究では高屈折材料を選定するうえで、耐薬品性・耐久性に優れて、なおかつ半導体の微細加工プロセスによる加工を前提として材料に焦点を当てた結果、窒化膜(Si_xN_x : 以後 SiN と表記)を用いることに着目した。

図 39 は白色光(TE 偏光)を垂直入射($\theta = 0$)した際の反射波長のシミュレーション結果を示す。シミュレーション結果より、789nm 付近に反射波長を有する結果が得られた。

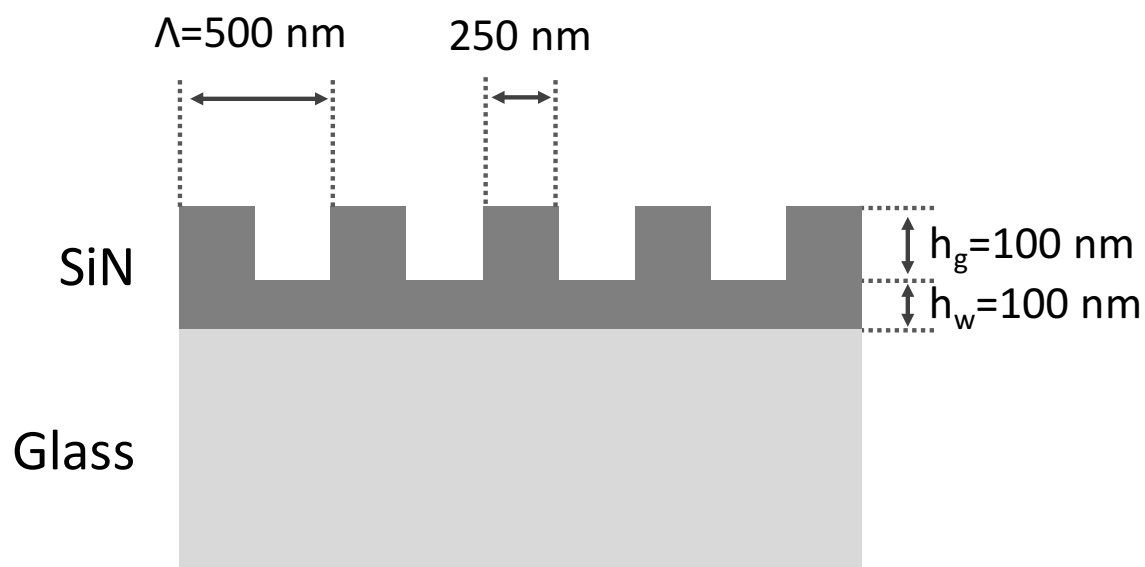


図 37 光の波長程度の周期構造を有する GMR フィルタの構造

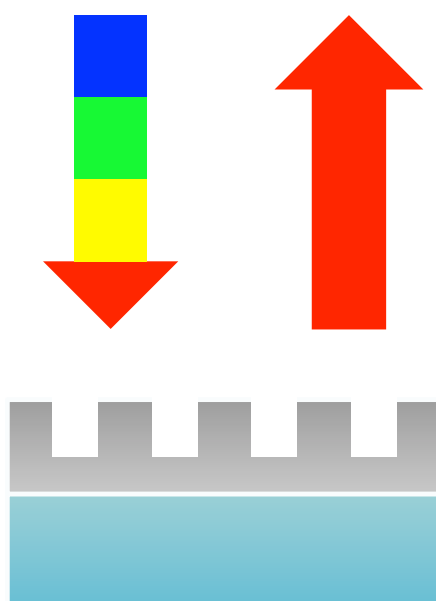


図 38 シミュレーション上の入射条件，センサ表面からの反射光を測定

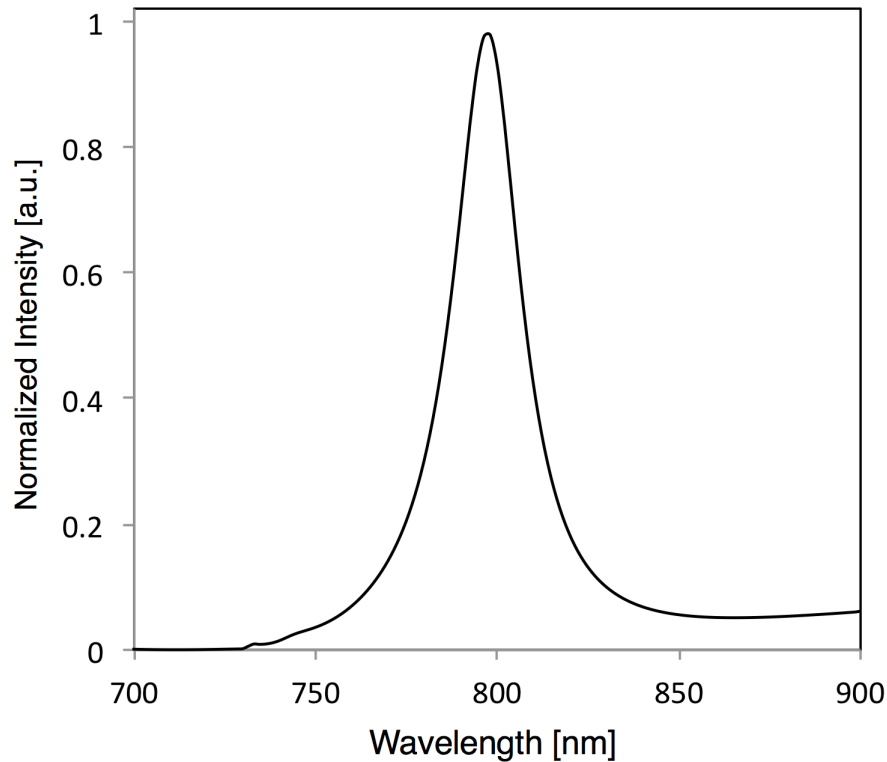


図 39 センサへの垂直入射に伴う反射波長シミュレーション結果

シミュレーションによる結果から、図 37 で提案する構造体を作製することで GMR フィルタが動作することが予測された。そこで、実際にシミュレーション上で示した構造を作製する。

図 40、表 4 (a)~(e)はそれぞれセンサの作製プロセス、各種条件を示す。初めにガラス基板上に化学気相成長法(Chemical vapor deposition : CVD)を用いてガラス基板上に窒化シリコン(Silicon Nitride : Si_xN_x)を 200nm 成膜する。成膜後に電子ビームリソグラフィによるレジストのパターンニングを行う。フォトリソストには、電子線描画用レジストである ZEP-520A-7(日本ゼオン株式会社)を用いた。使用したレジストはポジティブ型で 2000rpm×60sec のスピンコーティングにより 3000Å の厚さを形成する。電子線描画によるレジストのパターンニングを行う際に、チャージアップ防止膜として ESPACER 300(昭和電工株式会社)を用いた。これは、基板表面が絶縁基板となっているためチャージアップが生じてパターンが正常に描画されない現象を防ぐために行う必要がある。

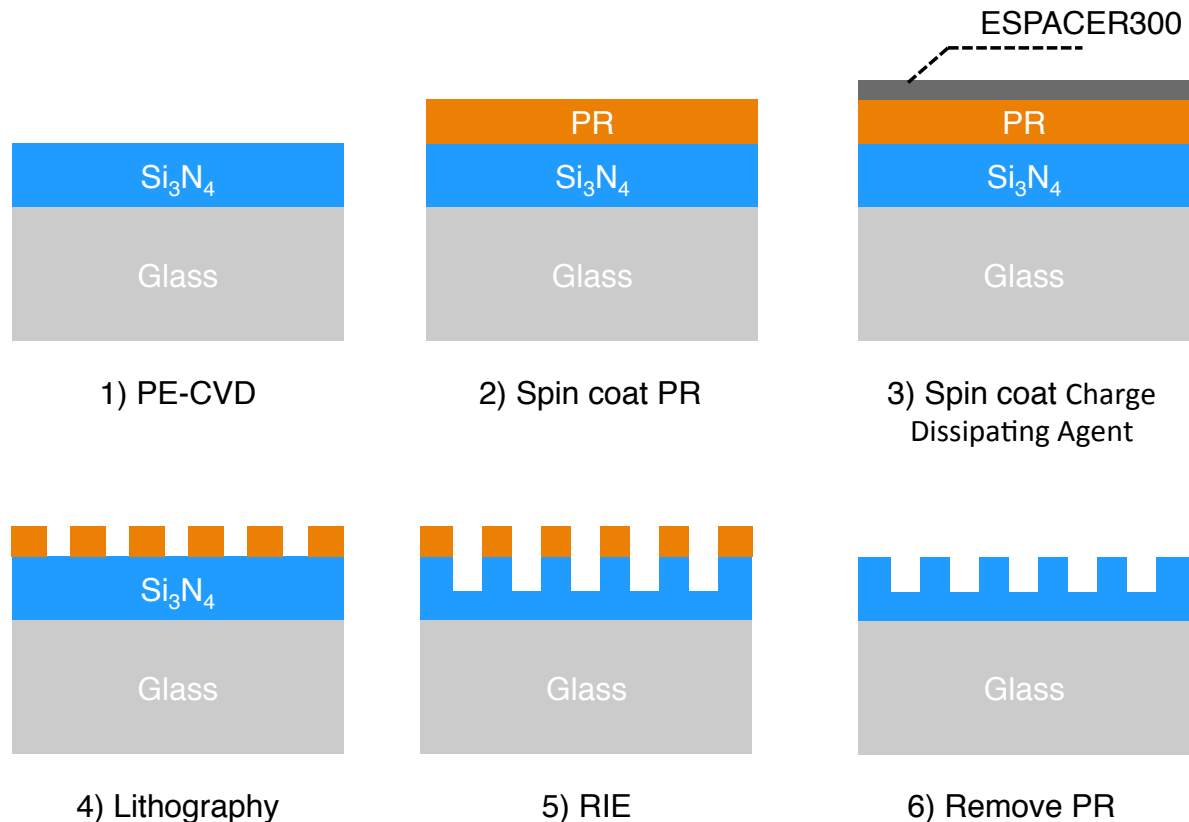


図 40 微細加工技術を用いた GMR フィルタの作製

図 41 は電子線描画用のレイアウトを示す。センサの作製の中で、現像工程や反応性イオンエッチング(Reactive Ion Etching : RIE)による加工に伴い、レジストのパターンが細くなることを考慮し、露光部を 230nm に設定し 270nm の幅でレジストが残るように工夫してある。描画レイアウトの作製には、**Layout Editor** を用いた。

電子線描画後の現像工程は次の通りである。はじめに、描画後の基板を水中で揺すり **ESPACER 300** を洗い流す。その後、現像液(**ZED-N50**)に基板を入れて現像を行う。パターンが非常に細く物理的な影響を受けやすいため、現像の工程では基板を現像液中で揺すらないようにする必要がある。現像後はメチルイソブチルケトンを用いてリンスする。そして最後に、120℃の温度でハードベークする。ハードベークの温度が高いとパターンが消える現象が生じるため温度設定は特に注意が必要である。

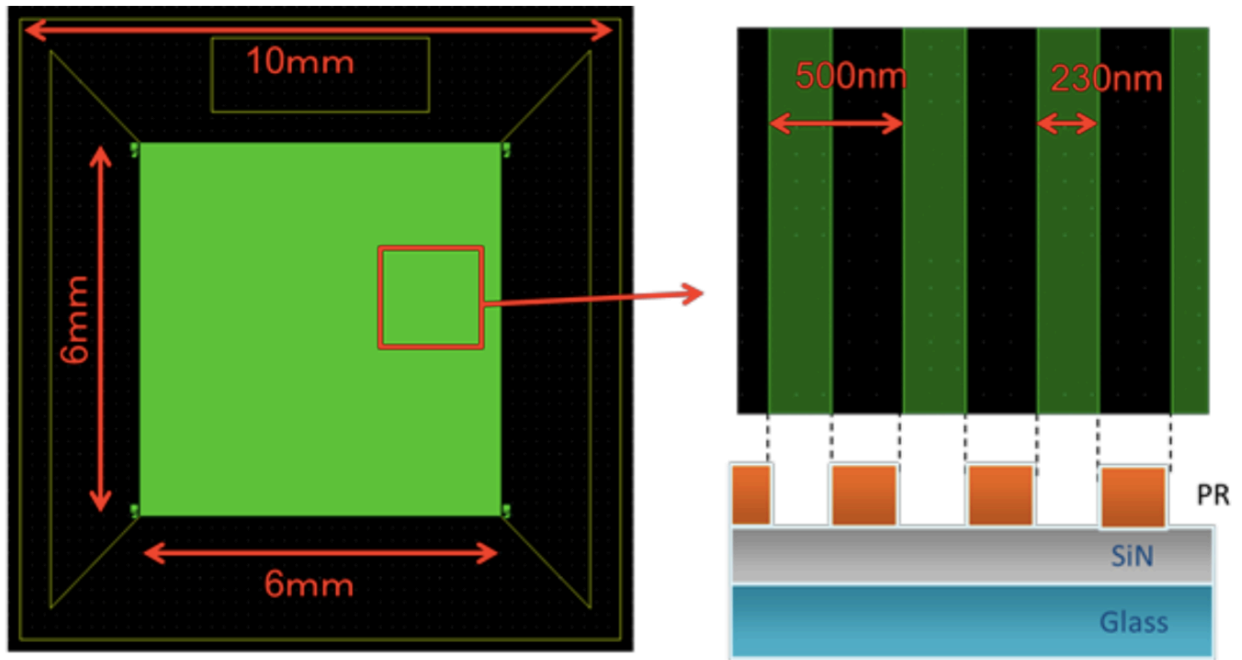


図 41 本研究で使用した電子線描画用レイアウト

フォトリソによるパターンの形成後，SiN 層のドライエッチングを行う．ドライエッチングには RIE を用いた．反応ガスには CF_4 を用いた．SiN 層エッチング後の残留フォトリソの除去には硫酸加水($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=3:1$)を用いた．SPM による洗浄後，純水を用いて基板の洗浄を行う．

図 42 は上記の工程を経て実際に作製されたセンサの外観図を示す．

表 4(a)レジスト塗布条件

工程	条件(温度, 回転数)	時間
①ベーク	180 °C	5 min
②ZEP-520A-7 塗布	STEP1 : 500 rpm STEP2 : 2000 rpm	5 sec 60 sec
③ポストベーク	180 °C	3 min
④ESPACER 300 塗布	STEP1 : 500 rpm STEP2 : 2000 rpm	5 sec 60 sec
⑤乾燥	60 °C	10 min

(b)電子線描画条件

名称	条件
使用装置	JEOL JBX-6300DA
加速電圧	25 kV
照射電流	200 pA
ショットピッチ	40 nm
電子注入量	45 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$

(c)現像条件

工程	条件	時間
①ESPACER 300 剥離	水洗い	1 min
②現像	ZED-N50	110 sec
③リンス	メチルイソブチルケトン	30 sec
④ハードベーク	120°C	5 min

(d)RIE 条件

名称	条件
使用ガス	CF ₄
流量	45 sccm
プラズマ電力	100 W
エッチングレート	100 nm/min
エッチング時間	1 min(≒100 nm etching)

(e)フォトレジスト除去

工程	条件	時間
ピラニア洗浄	H ₂ SO ₄ : H ₂ O ₂ = 3:1 (30cc : 10cc)	10 min
オーバーフロー	DI-Water	10 min
乾燥	窒素ブロー	適宜

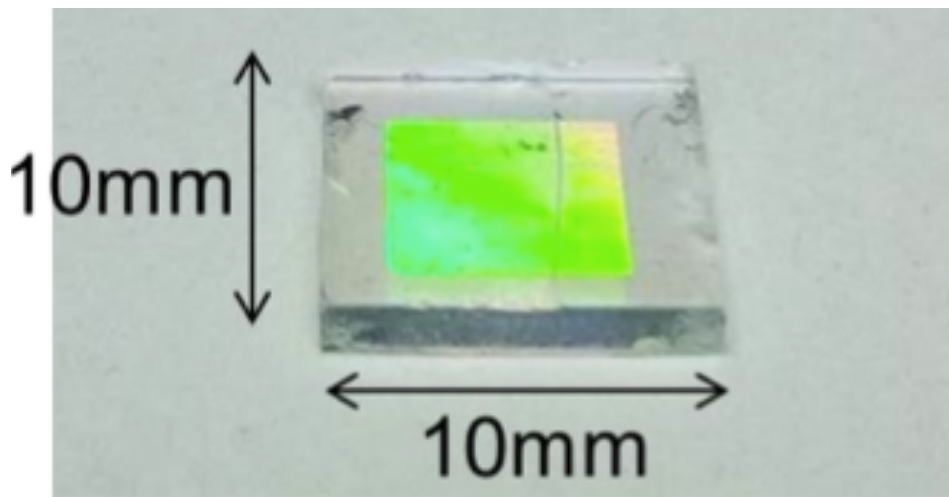


図 42 実際に作製したセンサの外観図

4.5. 作製した GMR フィルタの特性評価実験

4.5.1. 構造評価

前節の工程で作製したセンサの構造評価を行い，設計値との比較を行う．構造評価には，走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope : SEM)と，原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope : AFM)を用いた．周期構造の評価に SEM を，構造体の高さ評価には AFM をそれぞれ用いた．

4.5.2. 光学的特性の評価

図 43 は光学的特性評価を行うための測定系を示す．測定系は白色光源(LS-1 Tungsten Halogen Light Source , Ocean Optics 社)，偏光板，コリメートレンズ，ハーフミラー，分光器(HR4000, Ocean Optics 社)，光ファイバ(P400-2-VIS-NIR, Ocean Optics 社)から構成される．入射光(TE 偏光)はハーフミラーを介してセンサ表面に垂直に入射される．センサ表面からの反射光はハーフミラーを透過し，分光器に繋がっている光ファイバへと導入される．分光器は PC と繋がっており，PC 上の分光分析ソフトウェア(Spectra Suite)で測定光の解析を行う．

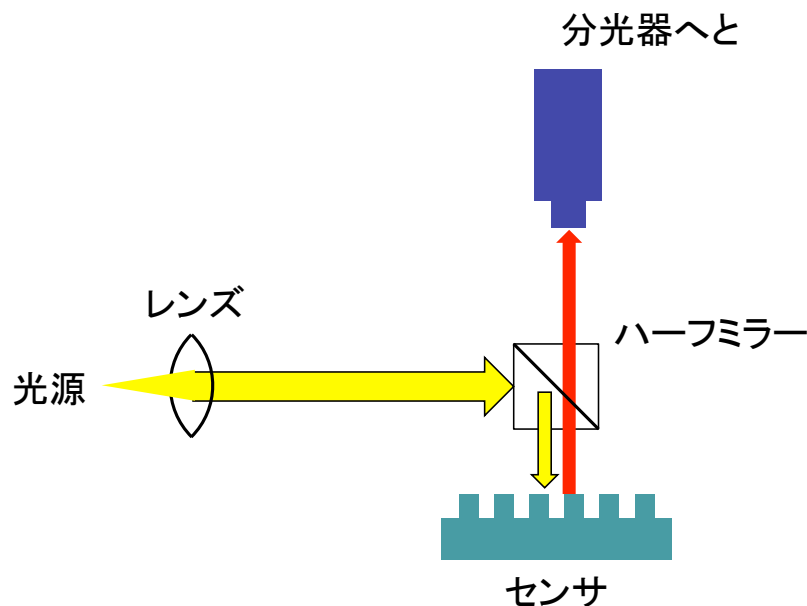


図 43 作製したセンサの基礎光学的特性の測定系

4.5.3. 可変波長フィルタの特性評価実験

図 44 は光学測定実験のセットアップを示す．可変波長フィルタ上に白色光を入射した時

に得られる反射光は、900nm 以下の波長については可視光用分光器(HR4000, Ocean Optics), 900nm 以上の波長については近赤外光用分光器(DWARF-Star, Stellarnet Inc.)の2種類の分光器をそれぞれ用いて解析した。本実験では入射角 θ_{inc} を 40 度に固定した状態でフィルタの水平角 φ_{inc} を 10 度毎に-90 度から+90 度の範囲で回転させた時に得られる反射波長を測定した。

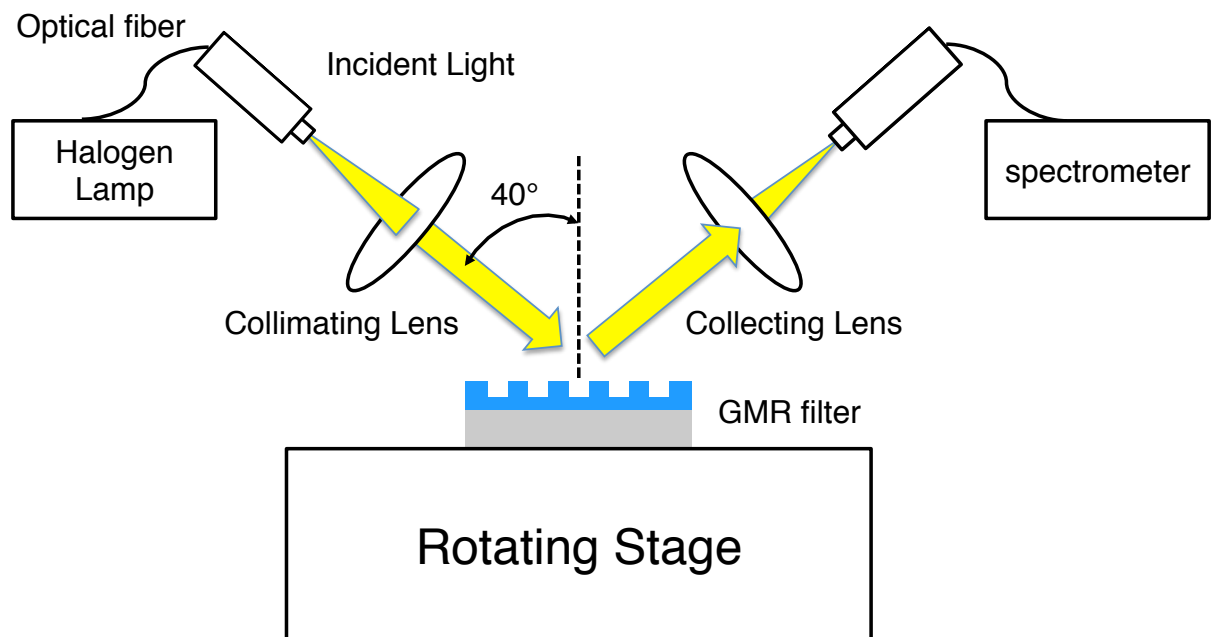


図 44 可変波長フィルタの光学特性評価の測定系

4.6. 実験結果・考察

4.6.1. 構造評価

図 45 (a)は SEM による GMR フィルタの表面観察像を示す．観察の結果，周期構造が形成されていることが確認できる．電子顕微鏡像および AFM 像の測定結果より GMR フィルタの周期幅 $\Lambda = 500\text{nm}$ で形成されており設計値の値を示した．図 45 (b), (c)は AFM による周期構造体の高さ評価を行った結果を示す．AFM を用いた GMR フィルタの格子溝 h_g の深さ測定の結果，約 $h_g = 120\text{nm}$ という結果が得られた．以後のシミュレーションでは実際に得られた値を反映させる．

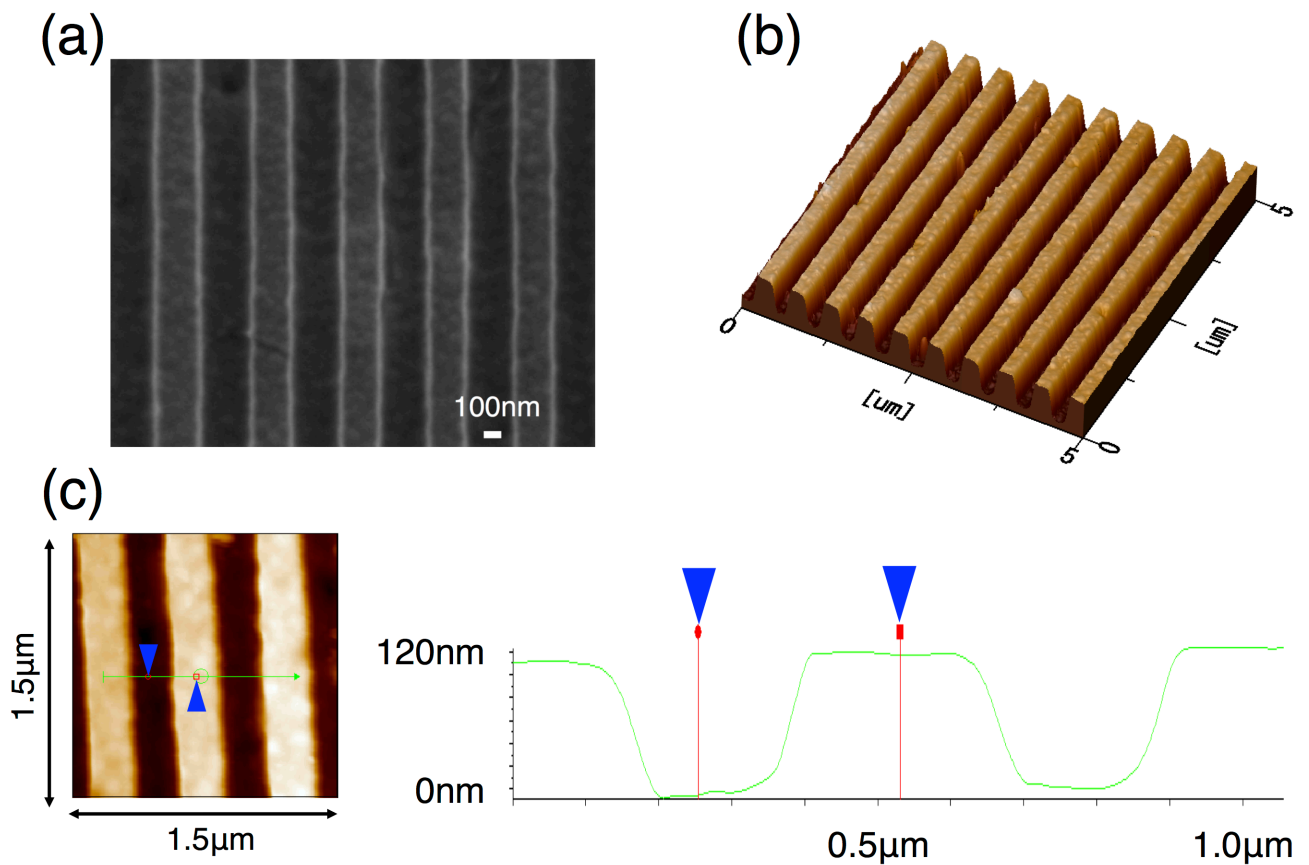


図 45 作製したセンサの構造特性評価

(a)電子顕微鏡蔵, AFM を用いた(b)3 次元像, (c)段差測定

4.6.2. 基礎光学的特性の評価

図 46 は、GMR フィルタ表面からの反射スペクトルを示す。横軸は波長，縦軸は最大強度で正規化された光強度を示す。実験で得られた結果を破線，測定値をもとにシミュレーションした結果を実線でそれぞれ示している。実験の結果，作製したセンサの反射光スペクトルは，共鳴波長に相当する波長の強反射が実験的に確認できており，その波長の値についてもシミュレーションで得られた結果と一致する事が確認できた。

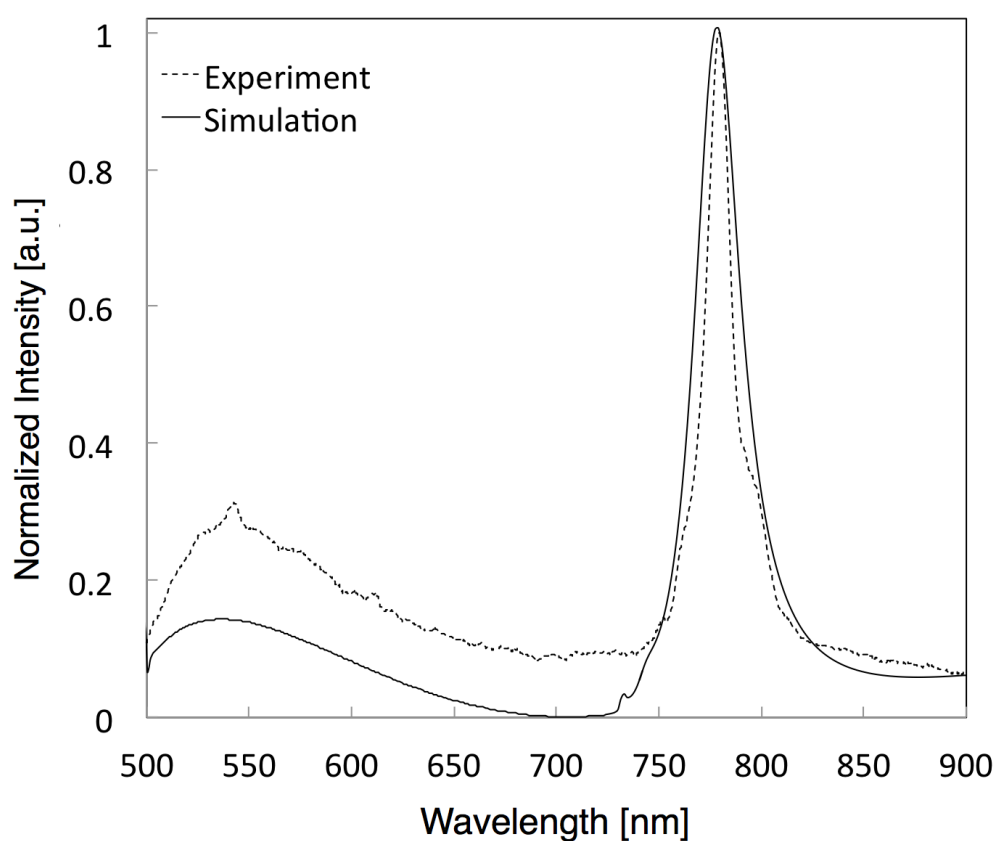


図 46 基礎光学測定結果とシミュレーション結果の比較

4.6.3. 可変波長フィルタの光学的特性の評価

分光測定の結果を図 47 に示す。GMR ピーク位置は、先述の固有値方程式を解くことによって理論的に予測され、実験値との良好な一致を示した。図 47 (a) は、入射光が TE 偏光である場合の GMR ピークの位置を示し、図 47 (b) は、入射光が TM 偏光である場合の結果を示す。各偏光について、+1 および-1 の回折次数に対応する $\pm 90^\circ$ 以外のすべての方位角に 2 つのピークがあった。実験で得られた最も低い反射波長は、TM モードで回転させない状態($\phi=0^\circ$)の場合であり約 470nm であったのに対して、高波長側については、TE モードかつ $\phi=90^\circ$ の時の約 1100nm という結果がそれぞれ得られた。したがって、630nm の非常に広い範囲において反射波長制御が達成された。しかし、反射波長が 875nm を超える波長では、図 47 (a) に示すように、反射効率は、低波長側の反射効率よりもはるかに低くなった。入射光が TM 偏光であった場合、GMR のピークは $\phi= -60^\circ$ から $+60^\circ$ においてバックグラウンドノイズと区別することができなかった。これは、実験で観察された 4 つのモードのうち、 TM^{-1} モードが最も低い回折効率を有するという事実に起因すると考えられる[8]。図 47 から分かるように、TE および TM モードに起因する反射波長は重ならない。従って、実際に本手法を用いた単一の色選択フィルタとして用いる際には入射光に対して偏光フィルムを介して用いる必要があるなどの制約を有している。

図 47 中において、 $\phi = \pm 90^\circ$ では、2 つの GMR ピーク位置が 1 つに合流することを示している。これは、式 (2) から推測できるように $\phi = \pm 90^\circ$ において正および負の回折次数の伝播定数が等しくなるためである。

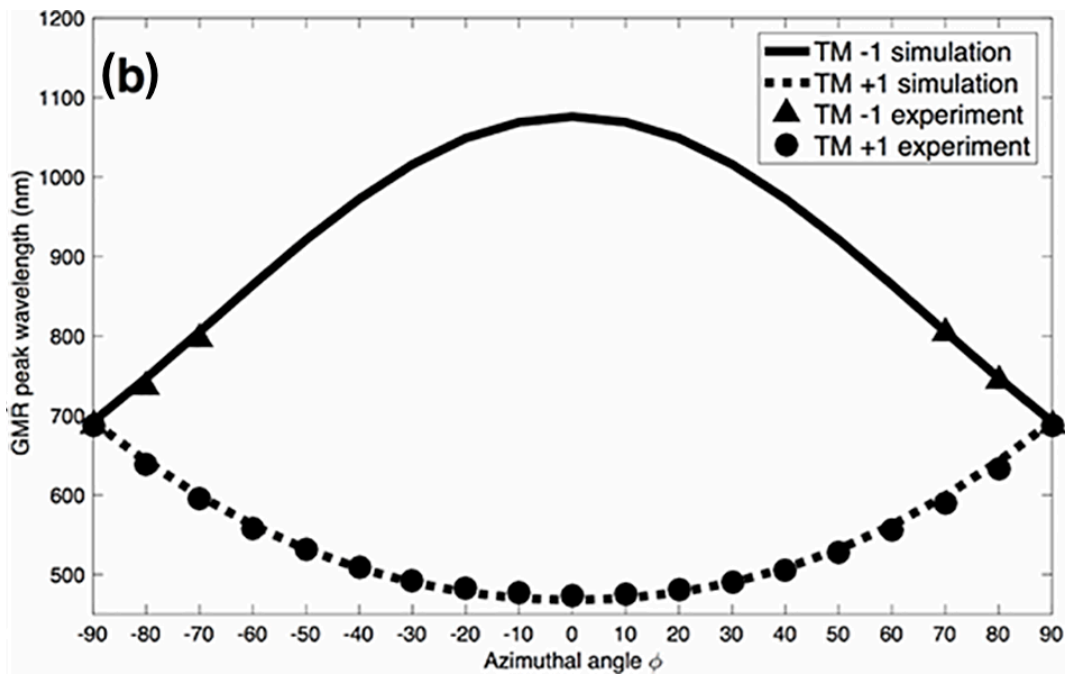
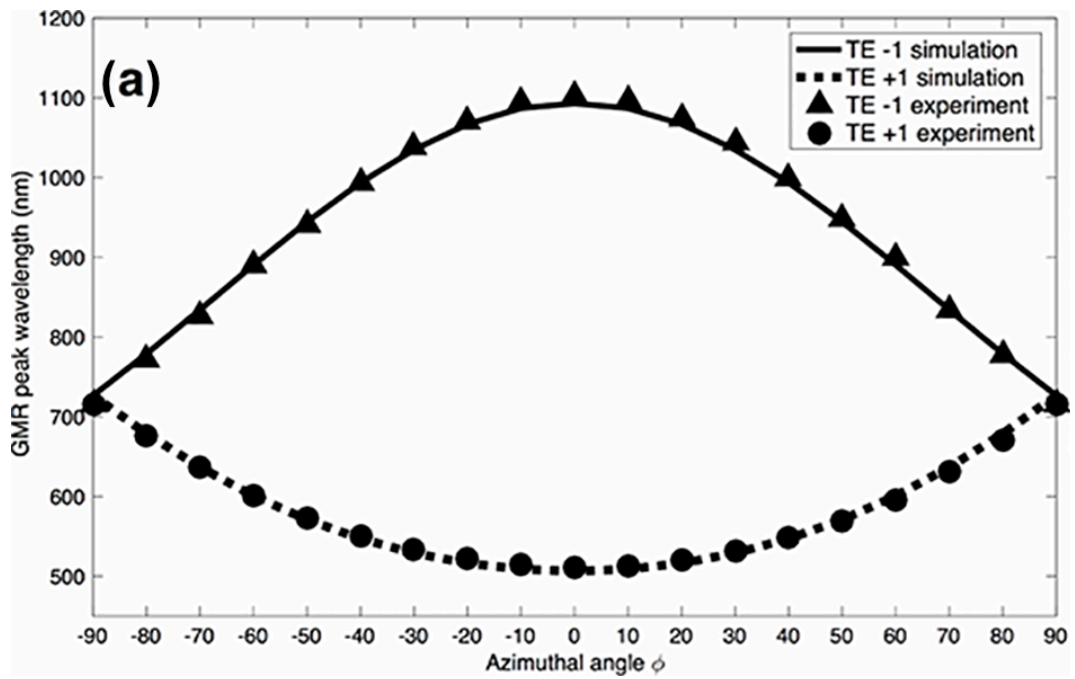


図 47 方位回転角の制御による反射波長の変化：(a) TE 偏光 (b) TM 偏光：両方の偏光について、回折次数+1 および-1 に対応する 2 つのピークが得られる

図 48 (a) は、500nm～1100nm の波長範囲における GMR フィルタから得られた反射効率とスペクトル特性を示す。反射効率は、可視光波長に対して 60～65% の値を示し、近赤外 (NIR) 領域の波長では約 30% に低下した。これら 2 つの領域の中間点は 875nm の波長で生じており、それ以下の範囲ではフィルタは実用上十分に効率的であった。したがって、375nm の非常に広い同調範囲が達成されたといえる。

ここで 875nm より高波長の波長において効率が低下する理由について考察を行う。我々の作製した 1 次元周期構造を有する GMR フィルタから得られる 27% (1100nm における) の最も低い効率値でさえ、方位回転[6]を用いる 2D ナノ構造によって得られる最高効率 (<20%) よりも大きい。本手法で得られる反射波長は、正と負の回折次数のピークが 1 つに合流する時 (図 48 (a)) に完全に円錐形のマウントに対応するので、反射効率は特に 712 nm (85%) で高くなる。GMR フィルタからの反射波長は、非共鳴波長のエリアでは低反射率を示す。今回作製したフィルタを用いた実験では、図 48 (b) に示すように、半値全幅 (FWHM) は、ピーク波長の全範囲にわたって 13nm～19nm の範囲内で得られる事ができた。

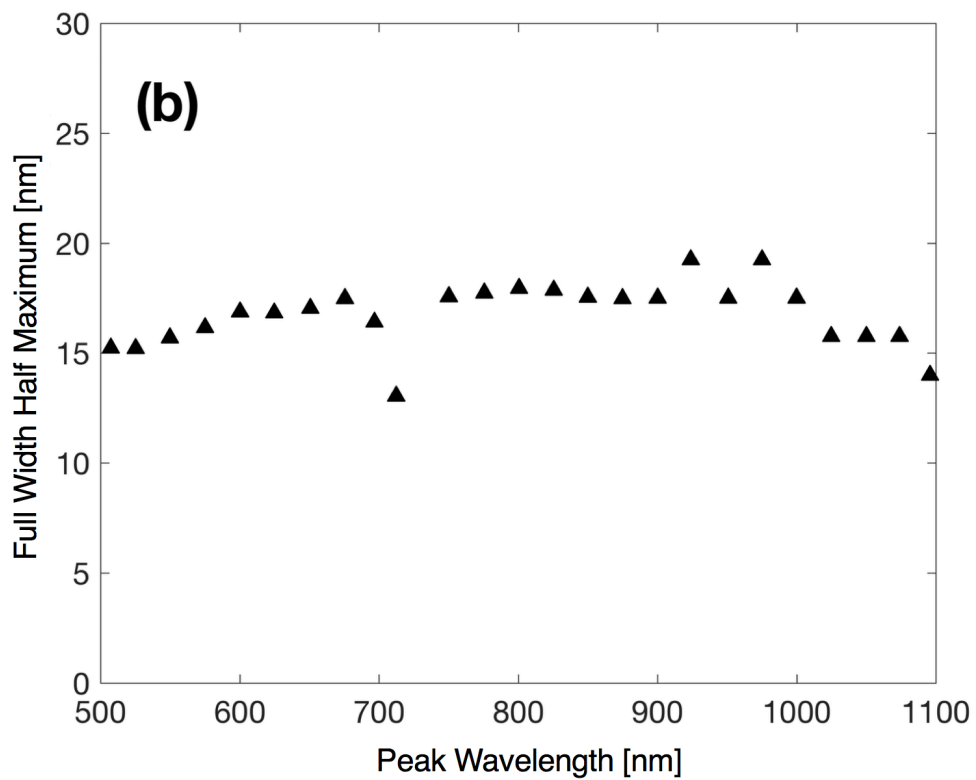
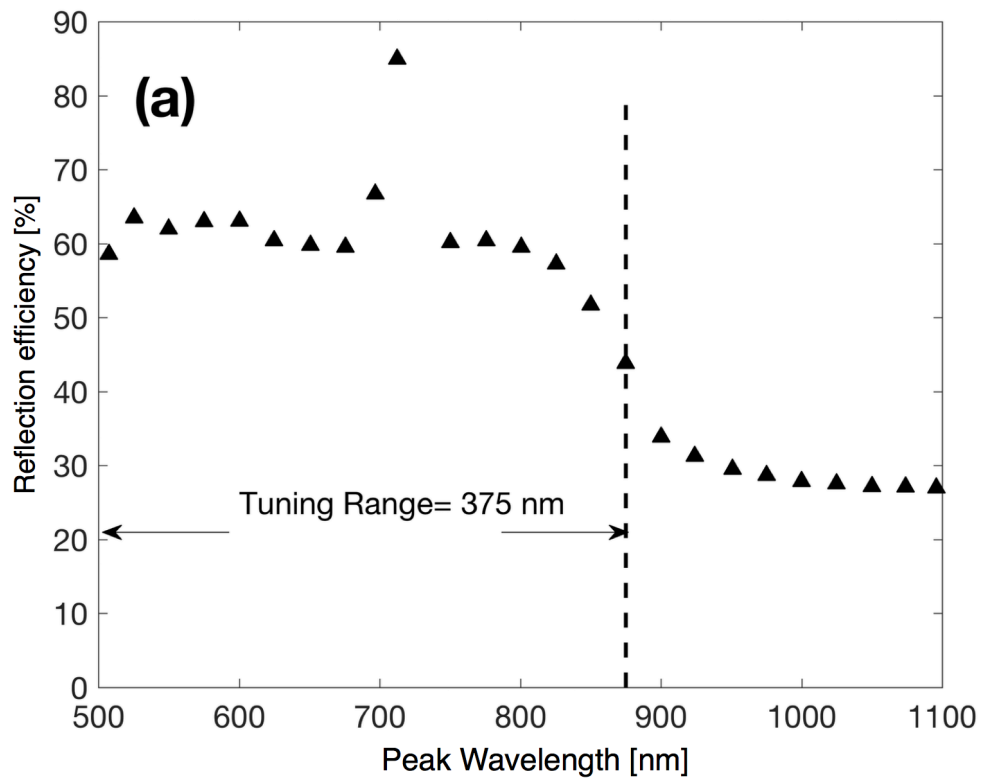


図 48 可変波長フィルタの(a)反射効率, (b)スペクトルの半値全幅(FWHM)

4.7. サマリー

本章では導波モード共鳴効果を用いたフィルタを設計・作製して構造・光学特性の評価を行った結果について報告した．本研究では，1次元の周期構造を有するフィルタにおいて，フィルタの水平回転に伴い共鳴条件の調整が可能であることを理論および実験の双方のそれぞれの観点から示した．

提案手法における新規性は，1次元の GMR フィルタを水平回転させることで高効率かつ広範囲で反射波長を制御する手法を示した点である．既存の手法では 2次元の GMR フィルタを水平回転させている．この時に制御できる波長の範囲は 150nm であった[6]．これに対して，本手法では反射波長が 500nm から 1100nm の範囲で波長を制御する事が可能である．この時，反射効率は可視光領域において 60~65%，近赤外線領域においては 30%付近の値を示した．提案手法において最も反射効率が低いのは反射波長が 1100nm の時に得られた 27%であるが，これは既存の手法で得られた最大の反射効率(20%)よりも高い値を示している．

提案手法を用いた反射波長の制御は GMR フィルタそのものの水平回転を用いているため，光学系の光路が変更されることなく任意の反射波長を取り出すことが可能である．そのため，スマートフォン上のカラーフィルターとの相性や目的に応じて，単一の GMR フィルタの方位回転でフィルタを再設計・作製することなく調整する事が可能となる．

4.8. 参考文献

- [1] Gallegos, Dustin, et al. "Label-free biodetection using a smartphone." *Lab on a Chip* 13.11, 2124-2132, (2013).
- [2] D. Lacour, G. Granet, J. P. Plumey, and A. M. Ravaud, *J. Opt. Soc. Am. A* 20, 1546 (2003).
- [3] D. W. Peters, R. R. Boye, and S. A. Kemme, *Proc. SPIE* 8633, 86330W, (2013).
- [4] G. Niederer, W. Nakagawa, H. Peter Herzig, and H. Thiele, *Opt. Express* 13, 2196–2200, (2005).
- [5] L. Chen, Z. Qiang, H. Yang, H. Pang, Z. Ma, and W. Zhou, *Opt. Express* 17, 8396, (2009).
- [6] Szeghalmi, M. Helgert, R. Brunner, F. Heyroth, U. Gösele, and M. Knez, *Adv. Funct. Mater* 20, 2053, (2010).
- [7] オプトロニクス, “光学技術者のための電磁場解析入門.
- [8] M. G. Moharam and T. K. Gaylord, *J. Opt. Soc. Am.* 73(4), 451 (1983).

5. GMR フィルタを用いた生体物質の検出

5.1. はじめに

第 4 章では本研究で使用する GMR フィルタを実際に作製・基礎光学特性の測定を行った。実験を行った結果、作製したフィルタが本研究で検出範囲と定めた範囲である可視光領域において機能することが確認された。本章では、作製した GMR フィルタを、生体物質の検出素子、すなわちトランスデューサとしての機能について検証する。

GMR フィルタを用いた生体物質の検出は、より正確に述べると GMR フィルタ表面上の生体物質に起因する屈折率変化を検出することである。従って、第一に GMR フィルタ表面の屈折率変化に対する感度応答性について評価を行う。その後、実証実験として生化学分野で多用されているアビジン-ビオチン反応を用いた生体物質の検出を行い、検出限界および測定可能範囲をそれぞれ求める。

5.2. 生体物質の検出原理

GMR フィルタ表面上に白色光を入射すると特定の波長の光が反射することは、理論的にも実験的にも示されてきた。改めて、伝搬定数の式中に ε_g があることが確認できる。

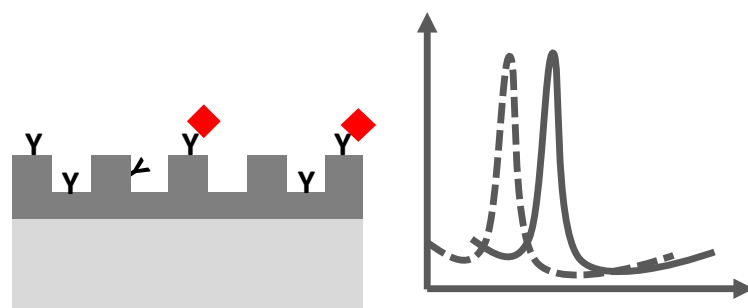
$$\beta = \beta_i = k \left(\sqrt{\varepsilon_g \sin^2 \theta} - i\lambda/\Lambda \right)$$

ここで、実際の測定条件下においては入射角や GMR フィルタの構造が定数となる。すなわち全体の光学系および GMR フィルタの構造そのものに変化がない状態を想定する。ここで、フィルタ表面上の屈折率が変化すると、

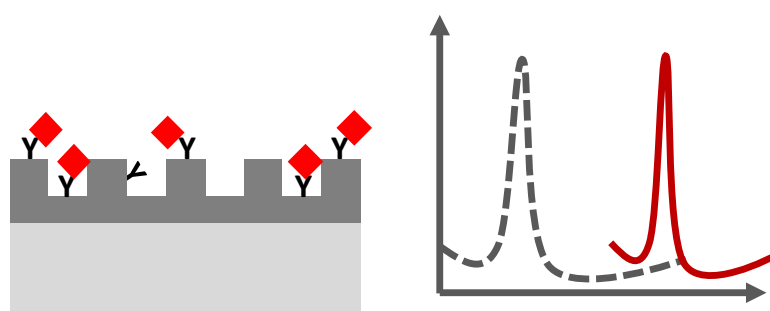
$$\varepsilon_g \rightarrow \varepsilon_g + \Delta\varepsilon$$

となる。上記で述べた条件式の整合性を一定に保つように共鳴波長 λ が変化する。したがって、生体物質のように高屈折率な物質がセンサの表面上に付着した際の屈折率変化に伴い、伝搬定数の整合性を満たす形で反射波長が変化する(図 49)。

検出する対象は空気の屈折率($n=1.0$)と比較して高い値を有するため、GMR を用いたセンシングでは必ず赤外シフトと呼ばれる高波長側への共鳴波長の変化が見られる。視点を変えると、GMR フィルタを用いたセンシング手法は、SPR や質量ベースのセンシング手法と同様に生体物質の吸着・解離について双方の挙動を確認することが可能である。



(a) 低濃度(屈折率変化:小)



(b) 高濃度(屈折率変化:大)

図 49 導波モード共鳴効果を用いたバイオセンシングの概念

5.3. 実験方法

5.3.1. 屈折率変化に対する変化特性

前項の実験結果より，作製したセンサが原理に基づく光学的特性を有するという結果が得られている．続いて，作製したセンサについてバイオセンサとしての動作を検証する．具体的には，センサ表面の屈折率を変化させた時の共鳴波長の変化を実験で確かめる．

実験方法として，異なる屈折率を有する試料をそれぞれセンサ表面に付着させて，その都度センサからの反射スペクトルを測定する．まず初めに，センサ表面に NaCl 溶液を直接滴下し反射スペクトルを測定する試みを行った．

しかし，センサ表面に試料を滴下すると図 50 に示すように，センサへの入射光や反射光は試料の最表面の形状に影響を受けるため，再現性のある実験を行うことが困難であるという結果が得られた．

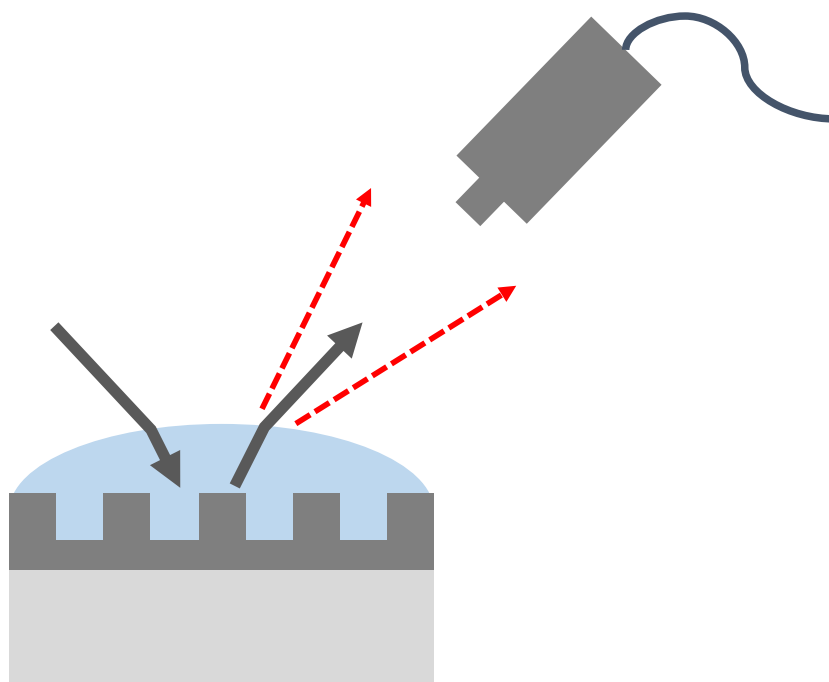


図 50 液体の表面張力による入射・反射光への影響

上記で述べたように図 50 で示す方法では再現性が得られないため、実験方法を改良する必要がある。そこで、改良を加えるにあたり以下の工夫を実験系へと実装した。

1. センサ固定具の実装（センサを動かす等の直接操作を無くし再現性を向上）
2. 流路の作製（溶液との反応をリアルタイムで観察できるようにした）
3. センシング面の反転（流路中にグレーティング面を配置した）

図 51 は実装したアイデアの模式図を示す。新たに提案する実験系は、ガラス基板上に PDMS(Polydimethylsiloxane)で作成した流路、センサ固定部、流路を塞ぐための外枠から構成される。また、流路内にチューブを挿入できるように設計している。そのため、センサに触れること無くシリンジを介して流路内に測定試料を送ることを可能とした。

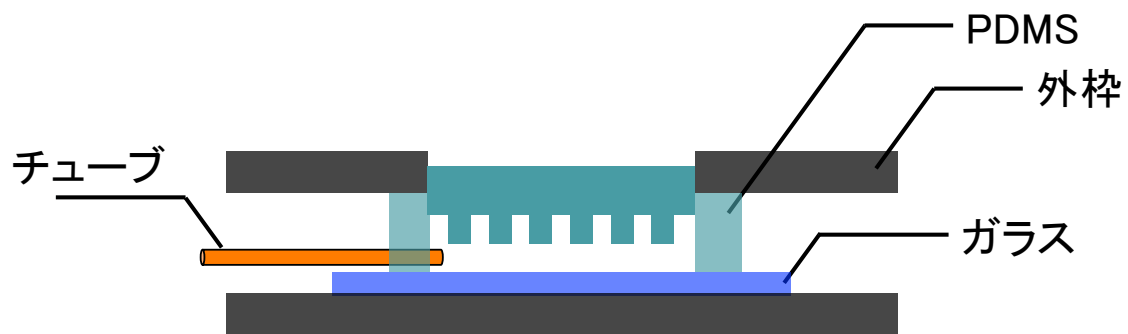


図 51 特性評価実験を行うための改良案

図 52 はアイデアの実装を可能とするための流路アタッチメントを示す。基本流路は、チューブ挿入部、試料プール、圧排気弁から構成されている(図 52 (a))。図 52 (a)の左側のアタッチメントの上に図 52 (a)の右側に示すクリスタルアタッチメントを重ねる。クリスタルアタッチメントの内枠は、作製したセンサと同じサイズとなっている。

図 52 (b)は 2 つのアタッチメントを重ねた際の模式図を示す。試料プール上部にセンサを配置することが可能となり、さらに流路の機能を付加することを可能とする。

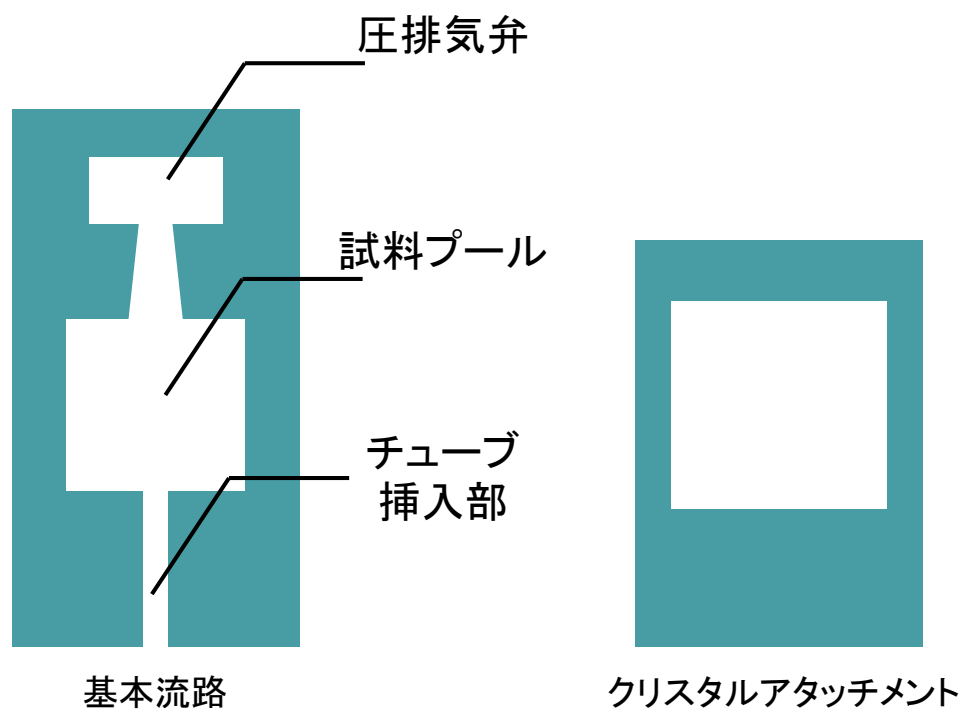


図 52 (a)流路アタッチメントの構成図



図 53 (b)重ねて使用した様子(中央の箇所にセンサの配置が可能)

図 52 で提案したアイデアを基に実際に作製する．作製するにあたり，1 枚の大きな PDMS シートを作製し，フェザーメスを用いて図 52 (a)で示す各アタッチメントの形状に切り出す．そして，ガラス基板上に順番に配置することによって流路アタッチメントを作製した．PDMS とガラス基板の接合面からの漏れだしを防ぐために，PDMS とガラス基板の接合プロセスを確立した．

図 54, 表 5 は PDMS とガラス基板の接合プロセス，各種条件を示す．切り出した PDMS アタッチメント及びガラス基板の接合面に対してプラズマ処理を行う．その後，プラズマ照射を行った面同士を張り合わせた後，ホットプレートを用いて加熱処理をすることで完全に接合する．上記の方法で接合した後で，PDMS をガラス基板から剥がすことは不可能なので，注意してアタッチメントを貼り合わせる必要がある．

図 55 は実際に上記の方法を用いて流路を作製し，センサを流路アタッチメントに取り付けた写真を示す．センサを流路アタッチメントに取り付けた状態で，流路に純水を流しても圧排気弁以外から液体が漏れ出さないことが確認できた．

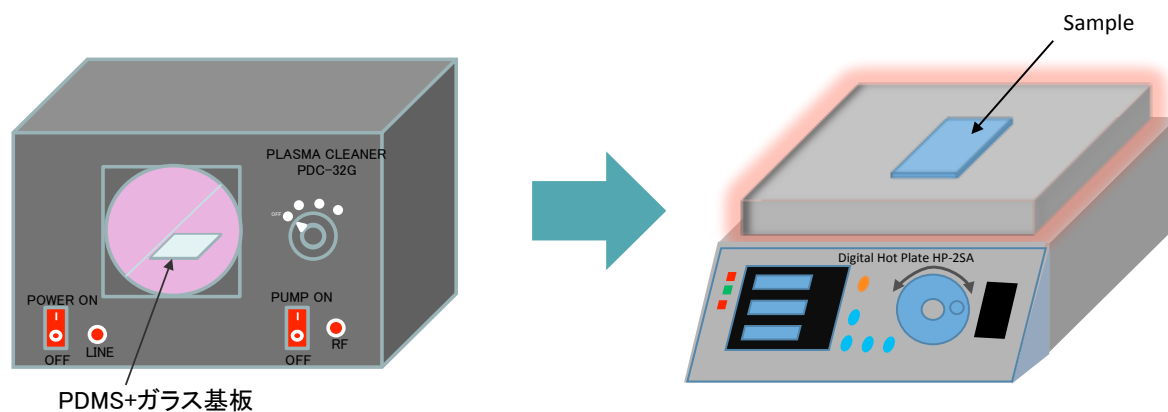


図 54 PDMS とガラス基板の接合プロセス

表 5 接合プロセス

工程	条件	時間
①真空引き	—	3min
②プラズマ処理	MED	2.5min
③接合面の貼りあわせ	取り出し後すぐに行う	
④加熱	100℃	2.5h

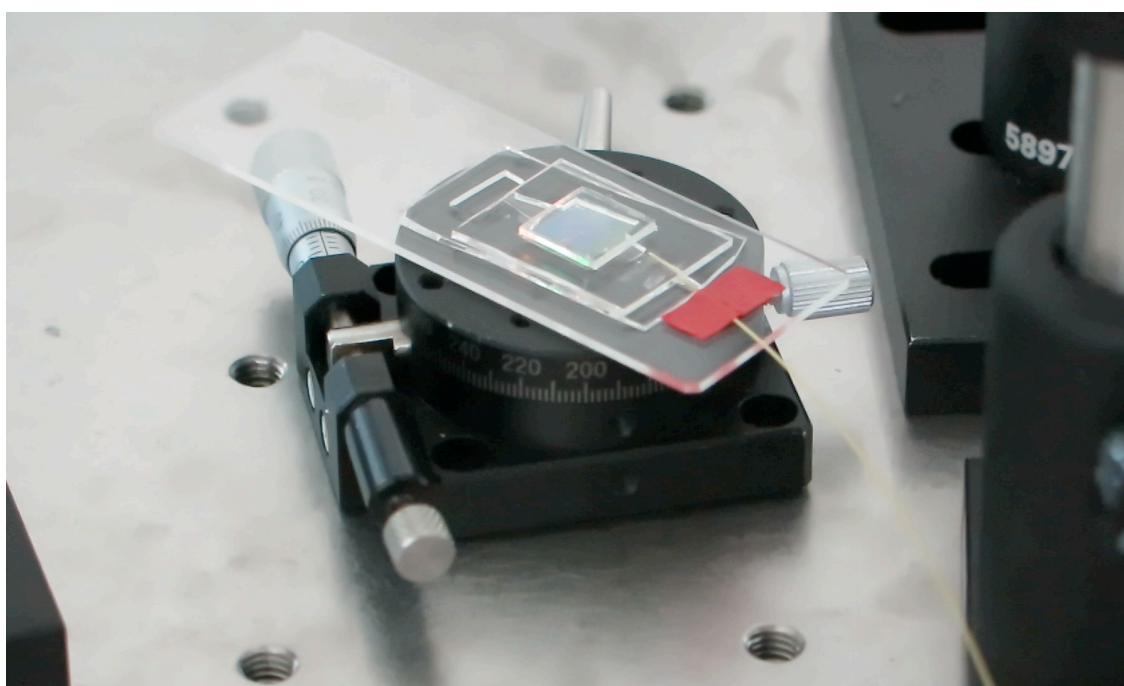


図 55 実際に作製した流路系にセンサを装着した様子

5.3.2. 流路アタッチメントを用いた屈折率変化の測定実験

3.5.2 項において作製した流路アタッチメントを用いて再度実験を行った。図 56 は実験のプロセスを示す。屈折率の異なる溶液試料を流路に流し、センサ表面全体が溶液試料で満たされた状態でセンサからの反射スペクトルを測定する。測定を終える度に、試料プール中の溶液試料を吸い出し純水によるセンサ表面の洗浄を行う。異なる試料を測定する時には、センサ表面全体が溶液試料で満たされる状態にまで試料溶液を入れた後でチューブから排出する。そして、再び溶液試料を入れた段階で反射スペクトルを測定する。この作業を行うことで前回のサンプルによる影響を抑えることが可能となる。

異なる屈折率を有する試料として、濃度の異なる塩化ナトリウム水溶液を用いた。

図 57 に示すように塩化ナトリウム水溶液の濃度を調製することで異なる屈折率を有する試料を作製することが出来る。実験で用いる溶液の屈折率は 1.33~1.37 の範囲で調整したものを使用した。純水($n=1.333$)を入れた状態で得られた共鳴波長を基準として、各試料溶液を入れた時の共鳴波長の変化量を測定する。

図 58 は実験の様子を示す。センサには 50 度の入射角かつ 60 度の水平角の条件下でハロゲンランプから白色光を入射する。センサからの反射光は光ファイバを介して分光器へと取り込んだ。

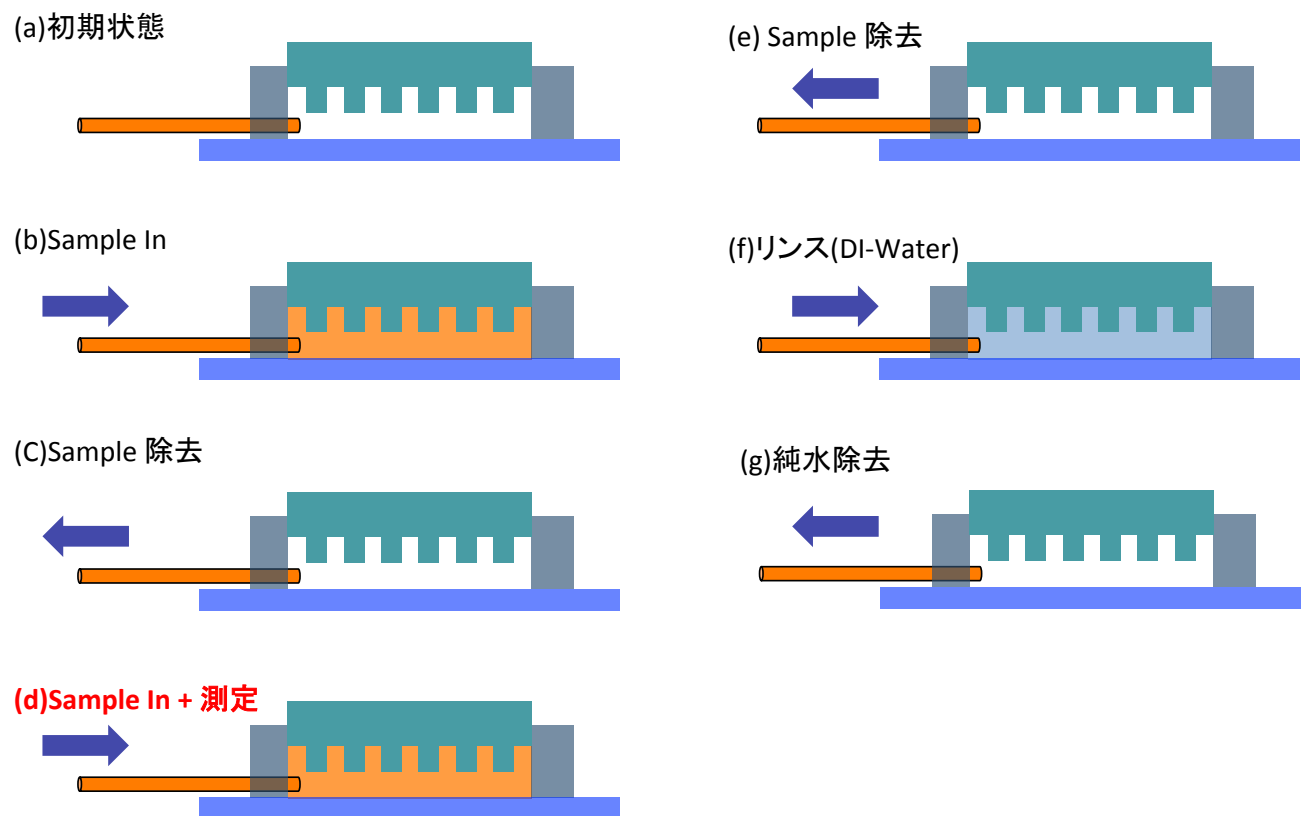


図 56 実験プロセス：作業(b)～(g)を繰り返す

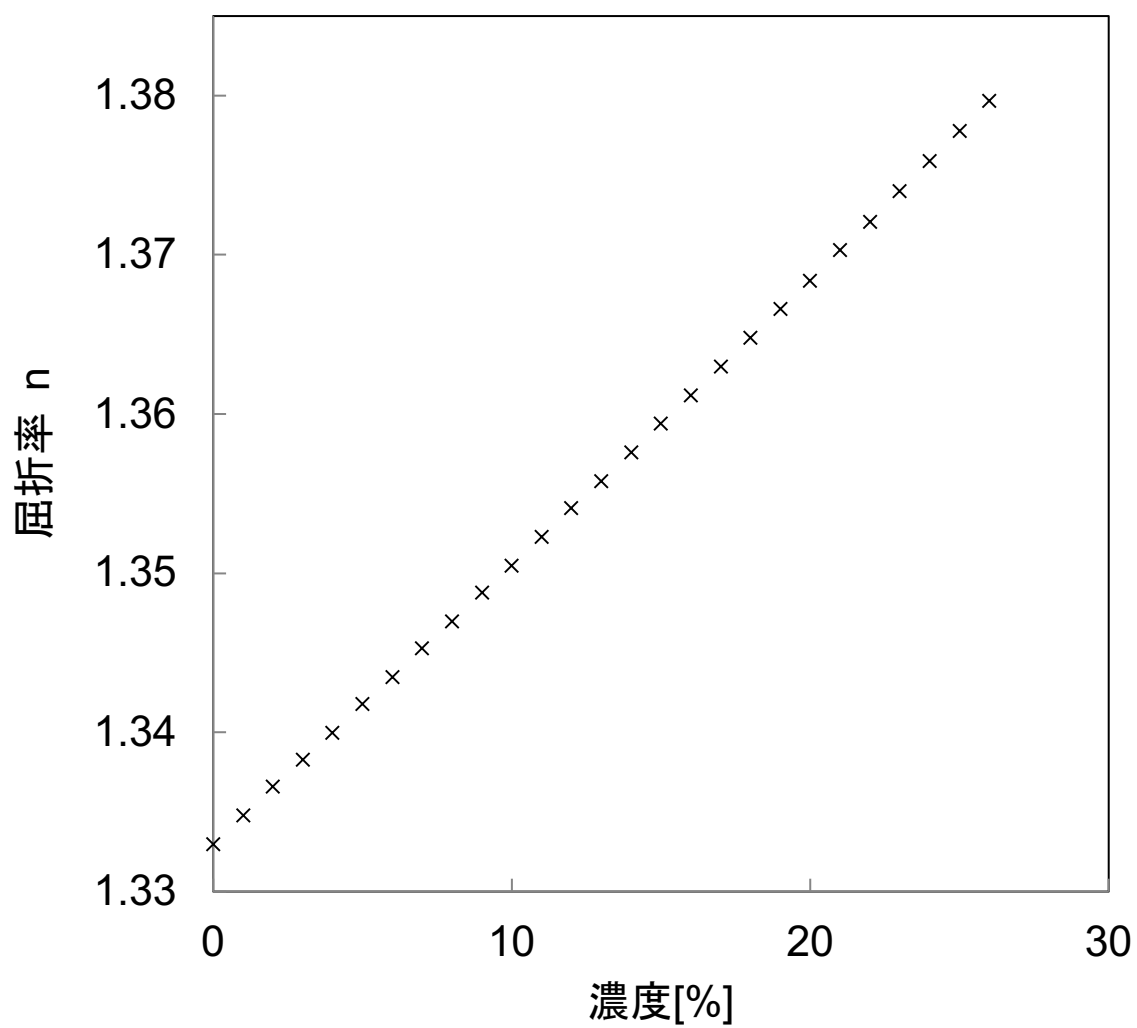


図 57 塩化ナトリウム水溶液の濃度に伴う屈折率変化[1]

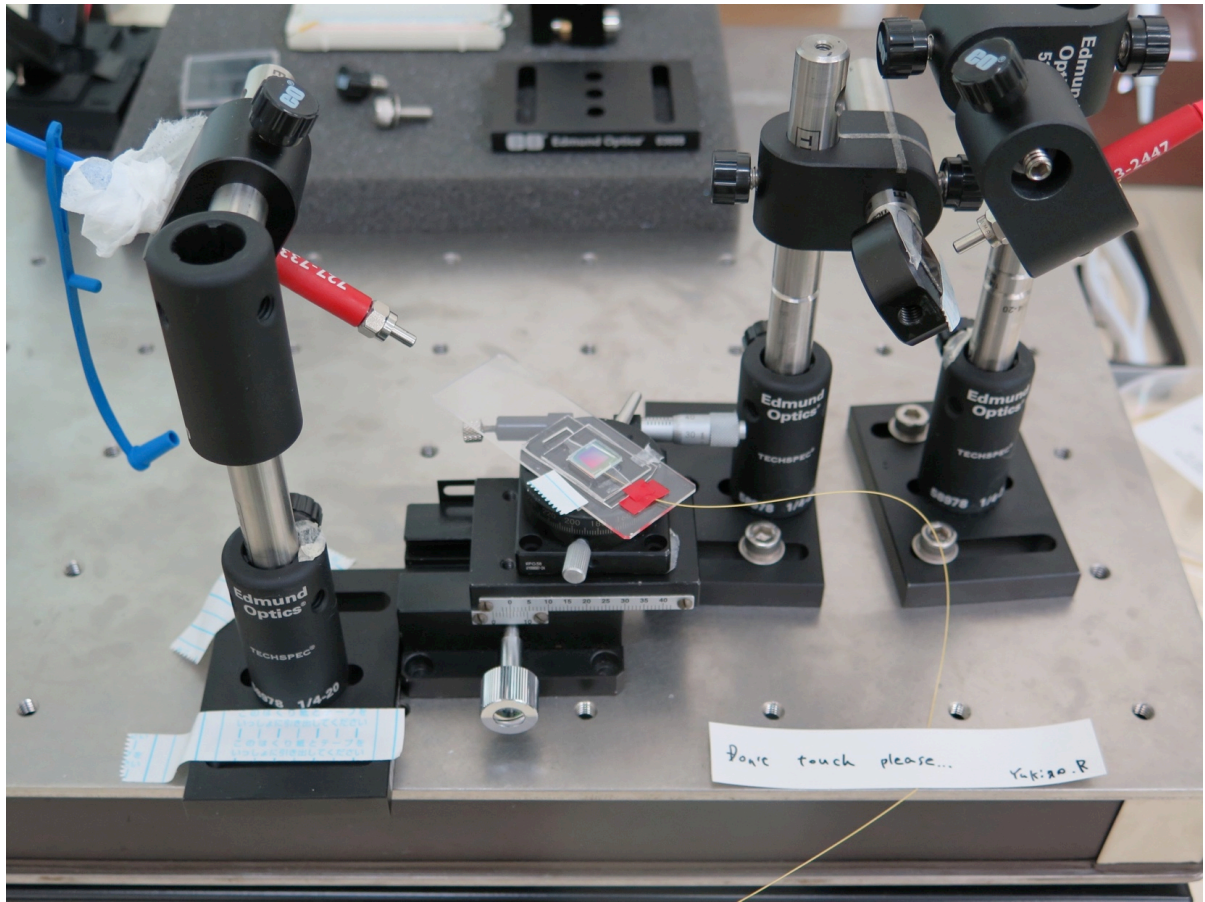


図 58 屈折率変化に伴う共鳴波長変化の検出実験の様子

5.3.3. アビジン・ビオチンを用いた生体物質の検出

5.3.3.1. アビジン・ビオチン結合

本研究では検出の対象とする生体物質としてアビジンに着目した。アビジンとは卵白中に存在する分子量約 68 kDa の糖タンパク質であり、図 59 (左側)で示すように、 β バレル構造 (β シートで作られる筒状の 2 次構造) で形成されるサブユニット 4 つから構成される。それぞれのサブユニットに 1 つずつビオチン分子が結合するポケットがあり、1 分子のアビジンに対して 4 分子のビオチンが結合する。アビジンは水溶性ビタミンであるビオチンに対して非常に強い親和性(結合定数: $K_b > 10^{15} \text{ M}^{-1}$)を示すことでも知られている。これは、通常の抗体・抗原反応の 100 万倍以上高い値であり不可逆的な結合を形成することを意味する。ビオチン(図 59 右側)は、構造が簡単な分子であり、比較的容易にタンパク質や DNA、薬剤などへの修飾が可能であるため、生体構造・機能解析など様々な研究で用いられている[2]。

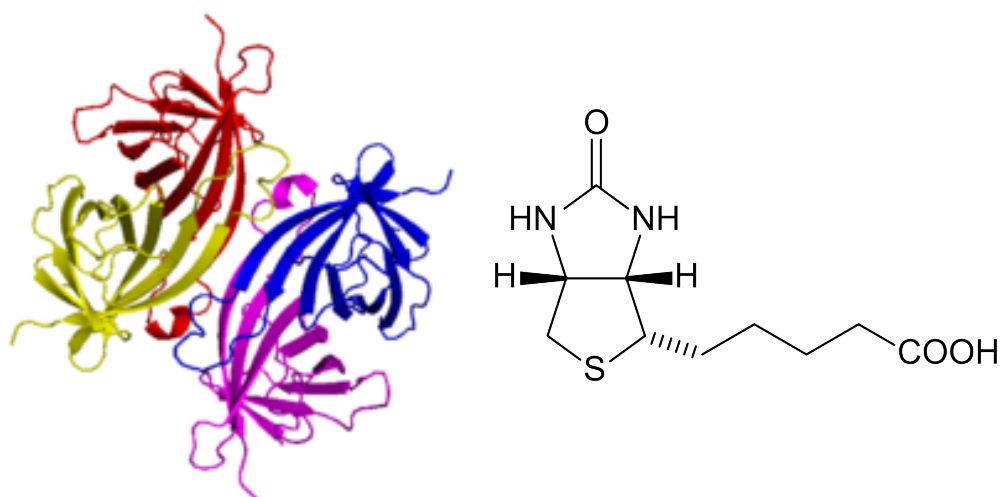


図 59 アビジンの構造(左側)とビオチンの構造式(右図)

アビジン・ビオチン結合はバイオセンシングの分野でも応用されている。代表的な応用例として、サンドイッチ法や標識アビジン法、ABC (Avidin : Biotinylated Enzyme Complex) 法が挙げられる。この中で、最も基礎となる手法であるアビジン・ビオチン結合を用いたサンドイッチ法について説明する。

図 60 はサンドイッチ法の概念図を示す。サンドイッチ法は、主に Enzyme-Linked

Immuno Sorbent Assay (ELISA)法で用いられている．あらかじめプレート表面には，標的とする抗原を捕捉する抗体を固定化しておく．この状態で，抗原を含む試料溶液をプレートに入れて反応させる．抗体抗原反応により抗原が抗体に付着した後に，ビオチン化抗体を入れることで，抗原を介してビオチン化抗体を付着させる．最後に蛍光標識アビジンを反応させると，ビオチン化抗体のビオチンを介して蛍光物質を修飾できる．最終的な蛍光物質の量は，試料溶液に含まれる抗原の量と相関があるため，蛍光量の測定を行い定量的な評価を行うことができる．

アビジンやビオチンは多様な物質に修飾することが容易であることから，蛍光物質や抗体だけでなく，抗原や酵素標識体にも直接ビオチンを修飾することで，間接的に検体の検出が可能となる．そのため，生化学分野において上記の手法は広く用いられている．

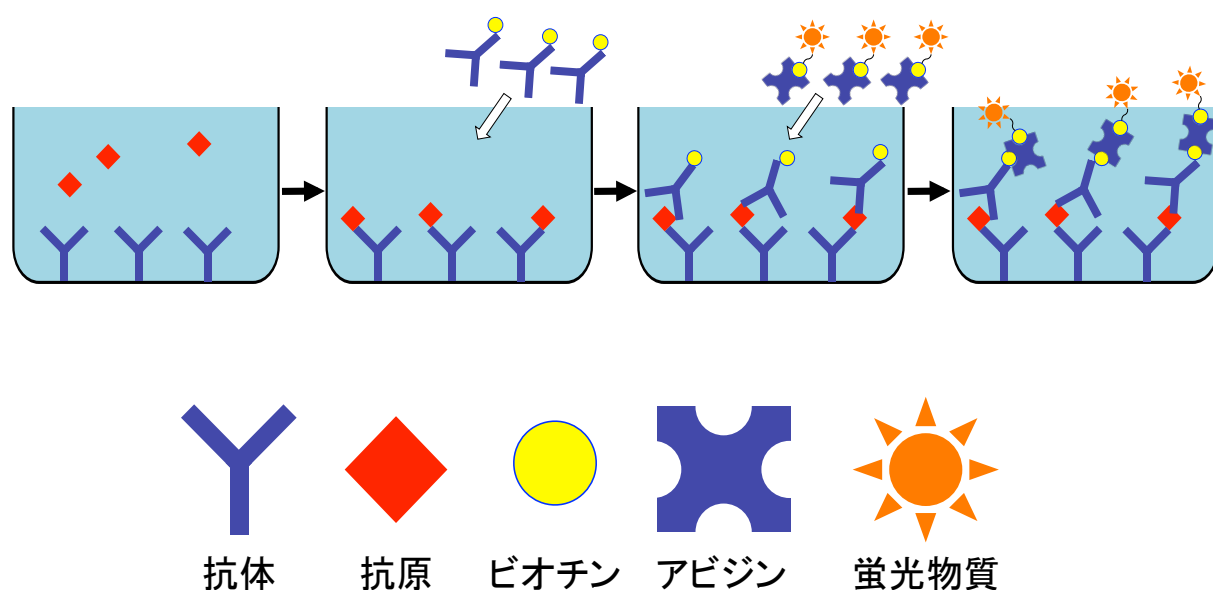


図 60 アビジン・ビオチン結合を用いたサンドイッチ法

5.3.3.2. 導波モード共鳴効果フィルタを用いたアビジンの検出

センサ表面にアビジンを付着させるためには、センサ表面にビオチンを導入する必要がある。センサ表面へのビオチンの導入は図 61 に示すプロセスを用いた。まず初めにセンサ表面にプラズマ処理を行ったサンプルを用意する。

続いて、シランカップリング剤を用いたアミノ基(-NH_2)の導入を行う。5% wt に希釈された 3-aminoprophltriethoxysilane (APTES)溶液中にセンサを入れる。反応時間は 10 分間、室温下で反応させる。反応させた後は、センサを取り出し純水によるリンスを行う。この処理によってセンサ表面に付着している余分な成分を取り除く。センサ表面にアミノ基を完全に固定化させるために、 120°C に加熱したホットプレート上で 10 分間加熱する。この処理により、シランカップリング剤の脱水縮合反応が進みアミノ基を固定化することが出来る[3-5]。

続いて、アミノ基を介してビオチンを修飾する。この時、以下に述べるようにいくつか注意しなければいけない事がある。APTES を用いてセンサ表面にアミノ基を導入した場合、第一級アミン(-NH_2)が表面に現れる。通常のビオチンは末端にカルボキシル基を有しているが、たんぱく質やセンサにビオチンを固定化する時には、図 62 に示すように、ビオチンの末端にあるカルボキシル基に N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステル(NHS エステル)を導入した NHS-Biotin が広く用いられている。NHS 基は第一級アミンと反応し化学結合が生じる。そのため、図 63 に示すように APTES で第一級アミンを導入した後に、NHS 基を有するビオチンを反応させることでセンサ表面にビオチンを導入することが出来る[3],[5]。

この時、pH は 7-9 の範囲で反応させる。NHS-Biotin は、通常のビオチンに対して異なる性質を有する。最も気をつけなければいけない点は、水溶性を示さなくなることである。これは、通常のビオチンでは末端にカルボキシル基(COOH)を有しており、親水性を有するためである。これに対して NHS-Biotin は、ビオチン末端のカルボキシル基を用いて NHS 基を導入するため親水性が失われる。

以上のことから、NHS-Biotin の溶媒には、純水ではなく DMSO(ジメチルスルホキシド)や DMF(ジメチルホルムアミド)が用いられている。また、NHS-Biotin は DMSO 等の溶媒において加水分解が生じるため、ビオチン化試薬は実験毎に調製することが望ましい。調

整した試薬を冷凍庫で保管することで加水分解を遅らすことも可能であり，この方法による使用期限はメーカーの公表では2週間とされている．そのため，実験を行うにあたり2mMに調整したビオチン化試薬原液 10mL を四等分(2.5mL×4 本)に分けて冷凍庫にて保管する．実験を行う際は，原液に 2.5mL(原液と同量)の DMSO を加えて 1mM に調製したビオチン化試薬を用いる．ビオチン化試薬で用いる NHS-Biotin は，東京化成工業株式会社より提供されているもの(CAS 番号：35013-72-0 製品コード：S0491)を使用した．DMSO は和光純薬工業(株)より提供されているもの (CAS 番号：67-68-5，販売元コード：046-21981,048-21985)を使用した．

最終的なビオチン化処理では，1mM に調製されたビオチン化試薬溶液中にアミノ基が固定されているセンサを入れる．室温下で 5 時間反応させた後，純水でリンスを行い窒素ブローでセンサ表面の余分な水分を飛ばす．以上の処理を行うことでセンサ表面はビオチンで修飾された状態となる．

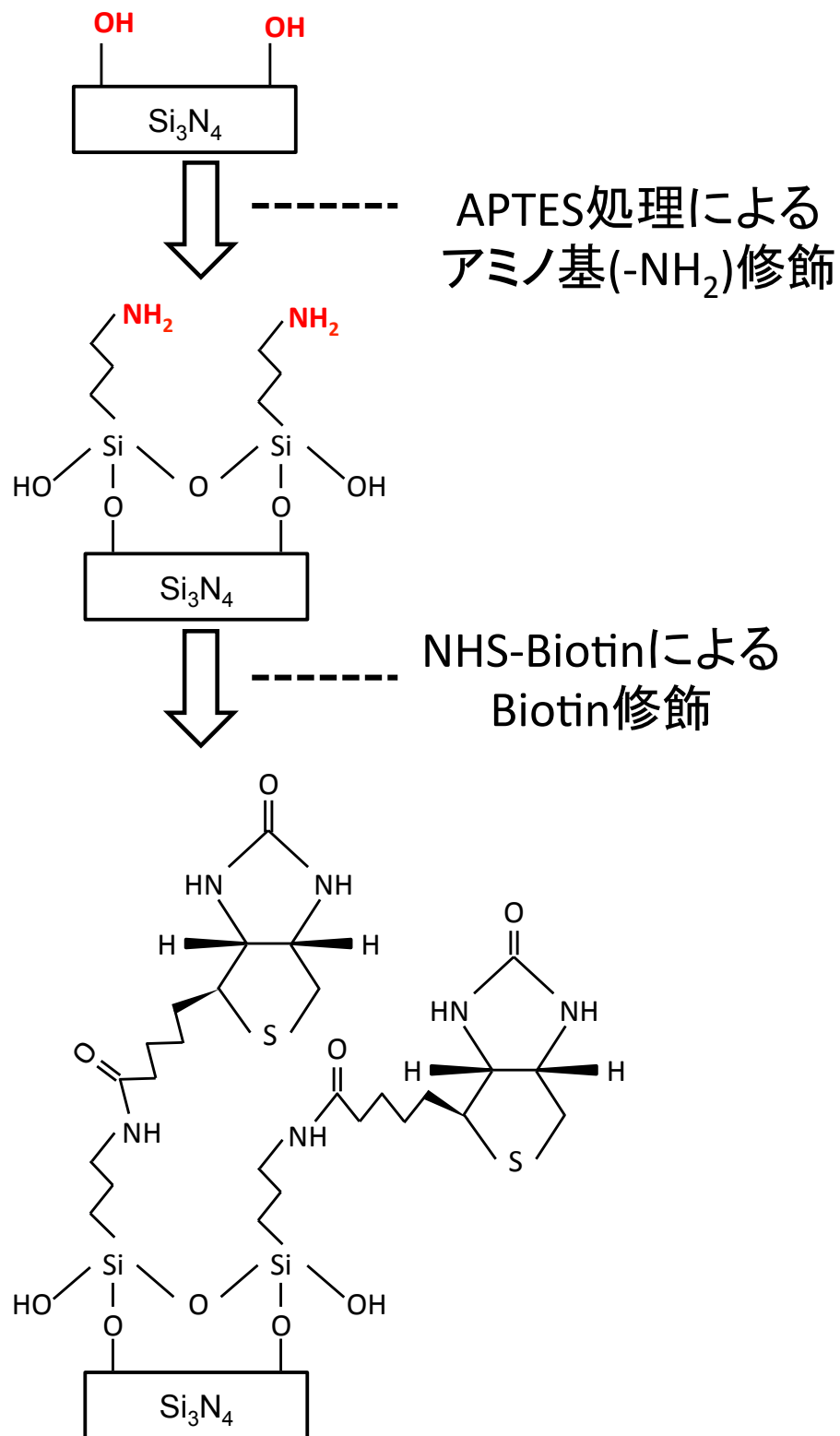


図 61 化学修飾技術を用いたセンサ表面のビオチン化処理

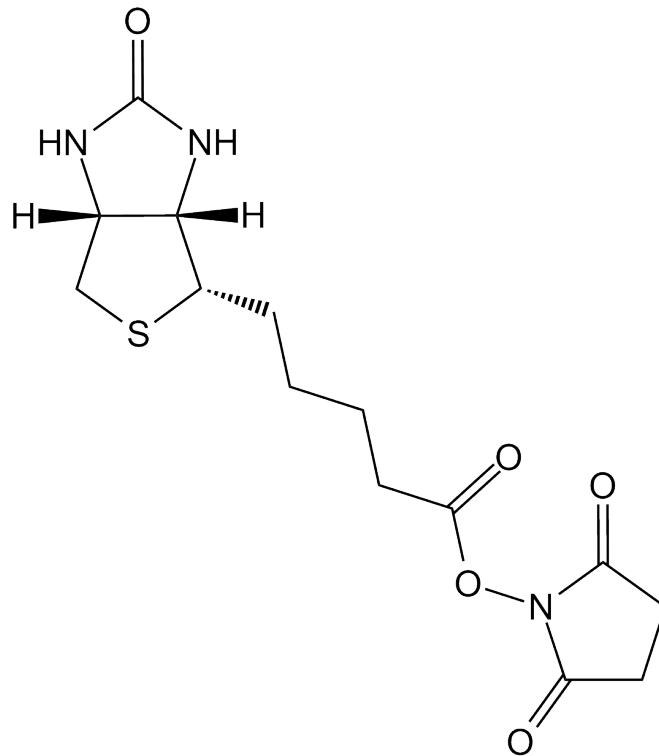


図 62 NHS-Biotin の構造式

基板, たんぱく質表面

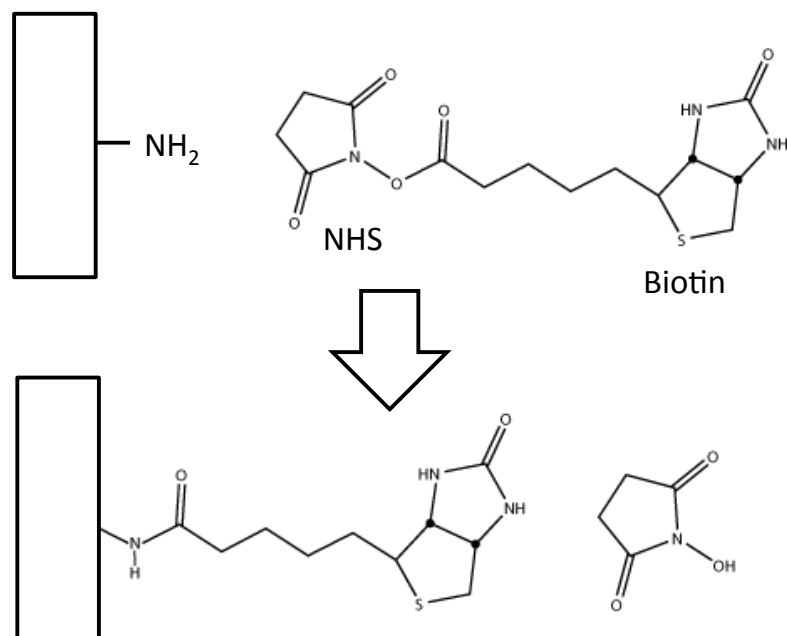


図 63 NHS-Biotin のアミノ基との反応

図 64 は光学系のセットアップを示す．本実験で使用するアビジンは，シグマアルドリッチ社から提供されているもの（CAS 番号:1405-69-2，製品番号:A9275-5MG）を使用した．初めに，アビジンがセンサ表面に付着していない状態で得られるピーク波長をそれぞれの分光器で測定する．この時に得られた値をそれぞれ， λ_{ref} とする．次にアビジン溶液 50 μ L をセンサ表面に 1 時間反応させた後に，PBS，純水の順番でリンスすることで表面に付着していないアビジンを完全に取り除く．リンス後は，表面の水分を取り除き十分に乾燥させる．そして，この状態で再度センサからの反射スペクトルを測定する．その際に得られたピーク波長を λ_{avidin} とする．この時，反射波長のシフト量 $\Delta\lambda$ は以下の式で求められる．

$$\Delta\lambda = \lambda_{avidin} - \lambda_{ref}$$

本実験で用いるアビジンの濃度は 100 nM, 1.0, 50, 100, 200 μ M の範囲で割り振り，それぞれの濃度における変化量を測定した．正確な実験を行うために，実験毎に SPM を用いてセンサを洗浄することで表面の有機物を完全に除去した．

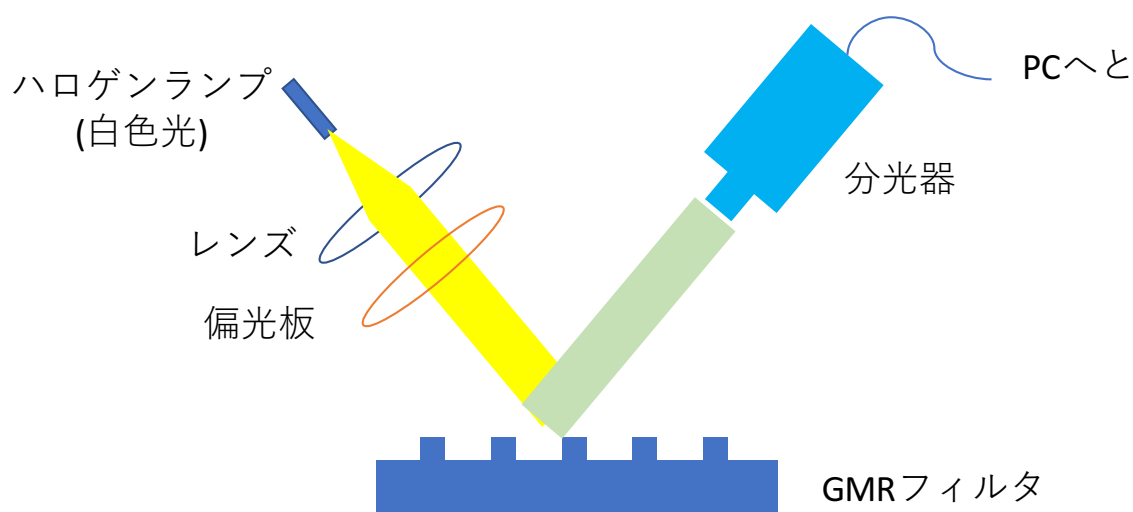


図 64 GMR を用いたアビジンの濃度検出実験

5.4. 実験結果・考察

5.4.1. 屈折率変化に対する変化特性

図 65 は屈折率変化に伴う共鳴波長の変化量を示す．横軸は使用した試料溶液の屈折率，縦軸は共鳴波長の変化量(Peak Wavelength Value : PWV)を示す．屈折率が高くなるに連れて PWV の値が大きくなっていることが確認できる．また，屈折率変化に対する PWV の変化量は線形的に変化していることが確認できる．このことから，作製したセンサが屈折率センサとして動作することが確認できた．

GMR フィルタの屈折率に対する感度は，nm/RIU [Refractive Index Unit]を用いて表される．これは，GMR フィルタ上の屈折率を 1.0 変化させた場合に，どの程度波長シフトが生じるかを計算した値であり，

$$Sensitivity[nm/RIU] = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n}$$

で算出される．本実験の結果，屈折率に対する感度は 69.3 [nm/RIU]と算出された．

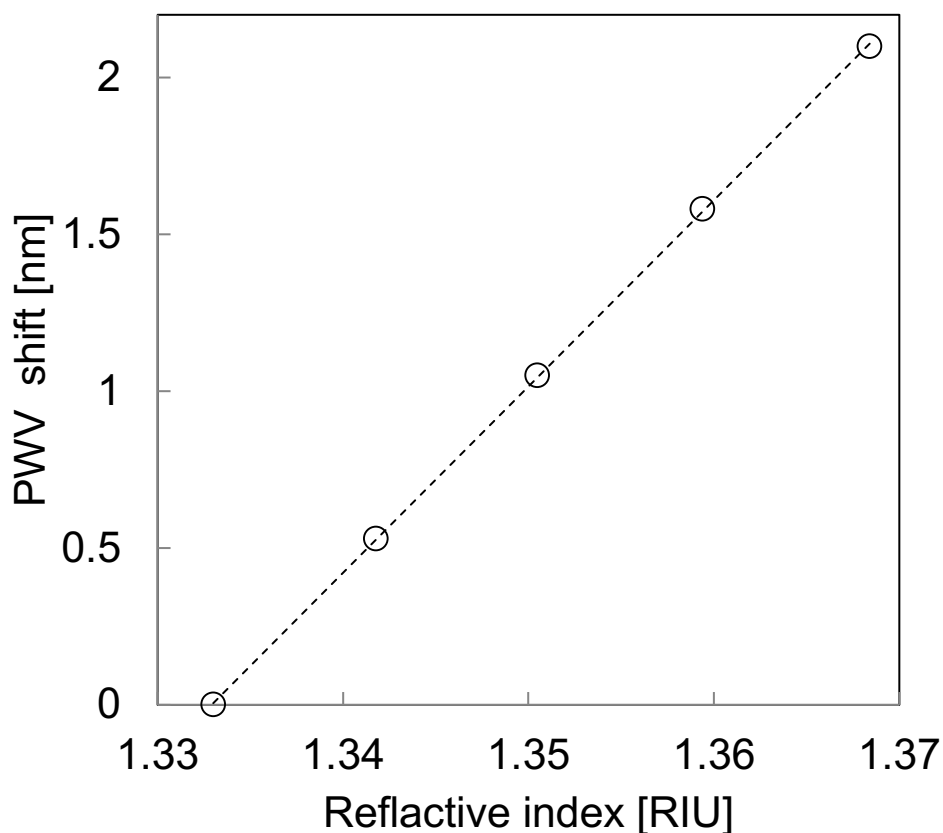


図 65 屈折率変化に伴う共鳴波長の変化量

5.4.2. アビジン-ビオチンを用いた生体物質の検出

図 66 はアビジン濃度を変化させた時の反射波長シフト量を示す．アビジン濃度が高くなるにつれて反射波長シフト量 $\Delta\lambda$ が大きくシフトしていることが確認できる．これは，センサ表面上の屈折率が徐々に大きくなっていることを示す．すなわち，センサ表面上のビオチンに固定化されたアビジンの量が増えていることが確認できており，導波モード共鳴効果フィルタを用いたバイオセンシングが実際に可能であるという結果を示す．本実験において，検出限界は 100nM である一方で，100 μ M の濃度において飽和する事が確認できた．今回用意した濃度サンプルにおいて，1 μ M から 100 μ M の範囲の間で定量検が可能であるという事が示唆される．

本実験では，検出限界はセンサではなく分光器の最小目盛や分解能に依存する．今回の実験で用いた分光器の最小目盛は 0.26nm である．すなわち，0.26nm 以下の変化については検出することが原理的に不可能である．GMR センサは原理的に極少量のセンサ表面上の屈折率変化が生じてても反射波長は変化するため，より測定分解能の高い分光器を用いることで検出限界は向上する．その他にもカーブフィッティングを用いてピークの中心波長を算出し，中心波長のシフトをピークシフトとして扱うことでより微細な変化を求める事が可能となる．

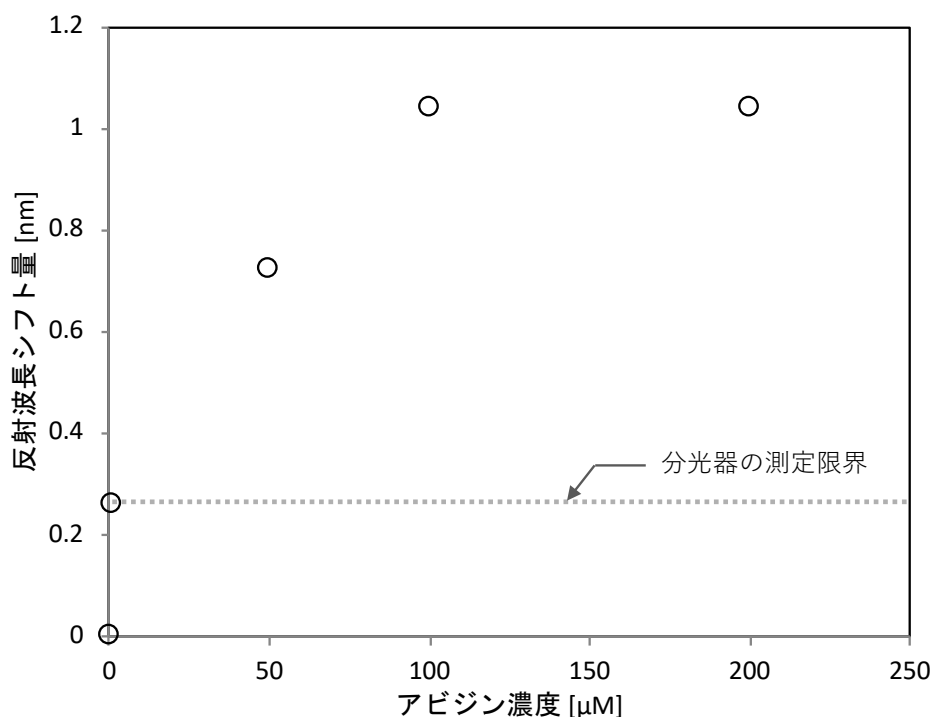


図 66 変化量の測定結果：左から順に 0.1, 1.0, 50, 100, 200 μ M

5.5. サマリー

本章では作製した導波モード共鳴効果フィルタをバイオセンサとして活用するうえでの原理検証を行った．異なる濃度の NaCl 溶液を用いた屈折率依存特性では，センサ表面上の屈折率変化に対して反射波長が変化する事を示した．実験の結果，作製したフィルタの屈折率変化に対する感度は 69.3 [nm/RIU] であることが示された．

最後に実証実験として，アビジンを用いた生体物質の検出実験を行った結果，実際にアビジンの濃度変化に伴う反射波長シフトが現れる事を実験的に示した．

5.6. 参考文献

- [1] “Conversion table Brix Salinity Refractive index.” [Online]. Available: http://www.topac.com/salinity_brix.html. [Accessed: 08-Feb-2016].
- [2] 手老龍吾, et al. "SiO₂ 表面へのアビジン単分子層作製と脂質膜形成への応用." 表面科学 26.8, 454-459, (2005).
- [3] S. Lee, S. C. Eom, J. S. Chang, C. Huh, G. Y. Sung, and J. H. Shin, “Label-free optical biosensing using a horizontal air-slot SiNx microdisk resonator.,” Opt. Express, vol. 18, no. 20, pp. 20638–20644, (2010).
- [4] S. Member, K. C. Popat, J. C. Aldridge, T. A. Desai, J. Hryniewicz, N. Chbouki, B. E. Little, O. King, V. Van, S. Chu, D. Gill, M. Anthes-washburn, and M. S. Unl, “Optical Sensing of Biomolecules Using Microring Resonators,” vol. 12, no. 1, pp. 148–155, (2006).
- [5] E. H. Williams, A. V. Davydov, A. Motayed, S. G. Sundaresan, P. Bocchini, L. J. Richter, G. Stan, K. Steffens, R. Zangmeister, J. a. Schreifels, and M. V. Rao, “Immobilization of streptavidin on 4H–SiC for biosensor development,” Appl. Surf. Sci., vol. 258, no. 16, pp. 6056–6063, (2012).

6. スマートフォンを用いた携帯型医療診断システムの開発

6.1. はじめに

これまで報告してきた実証実験は分光器や解析用の PC の利用を前提としている．そのため，依然として既存の医療診断技術と同様の問題が生じている．携帯型医療診断システムを実現する手法として，第 3 章でスマートフォンを検出器として用いる事を前提とした定量検出システムを提案した．その一方で，スマートフォンに搭載されているカメラを用いて GMR フィルタから得られる信号光を解析することが原理的に不可能である．これは，図 67 上部に示すように，スマートフォン上の光電変換素子から得られるデータは，主に R・G・B のそれぞれの強度の値(デジタル変換値)のみであり，波長そのものを算出する機能は存在していないことに起因する．

そこで，本研究では図 67 下部に示す手法を用いて信号光をスペクトルイメージとして測定することに着目した．上記で述べた原理は一般的な分光器と同様の検出原理である．ここでの違いは，回折格子によって回折された光を 1 次元アレイ状の光電変換素子で検出するか 2 次元アレイ状の光電変換素子で検出するかである．そのため，本手法を検出原理とした分光分析システムを構成することでスマートフォンを分光器の機能を有した検出器として活用できると考えた．スマートフォンを分光器として機能させることで，これまでに取り組んできた生体物質の定量検出についてもスマートフォン上で行うことが可能となる．

本章では，まずはじめに本研究で着目しているスマートフォンや ICT などの近年の状況・取り組みについて紹介する．次いで，本研究の目的である携帯型の定量検出手法を実現するために，検出装置としてのスマートフォン応用について述べる．

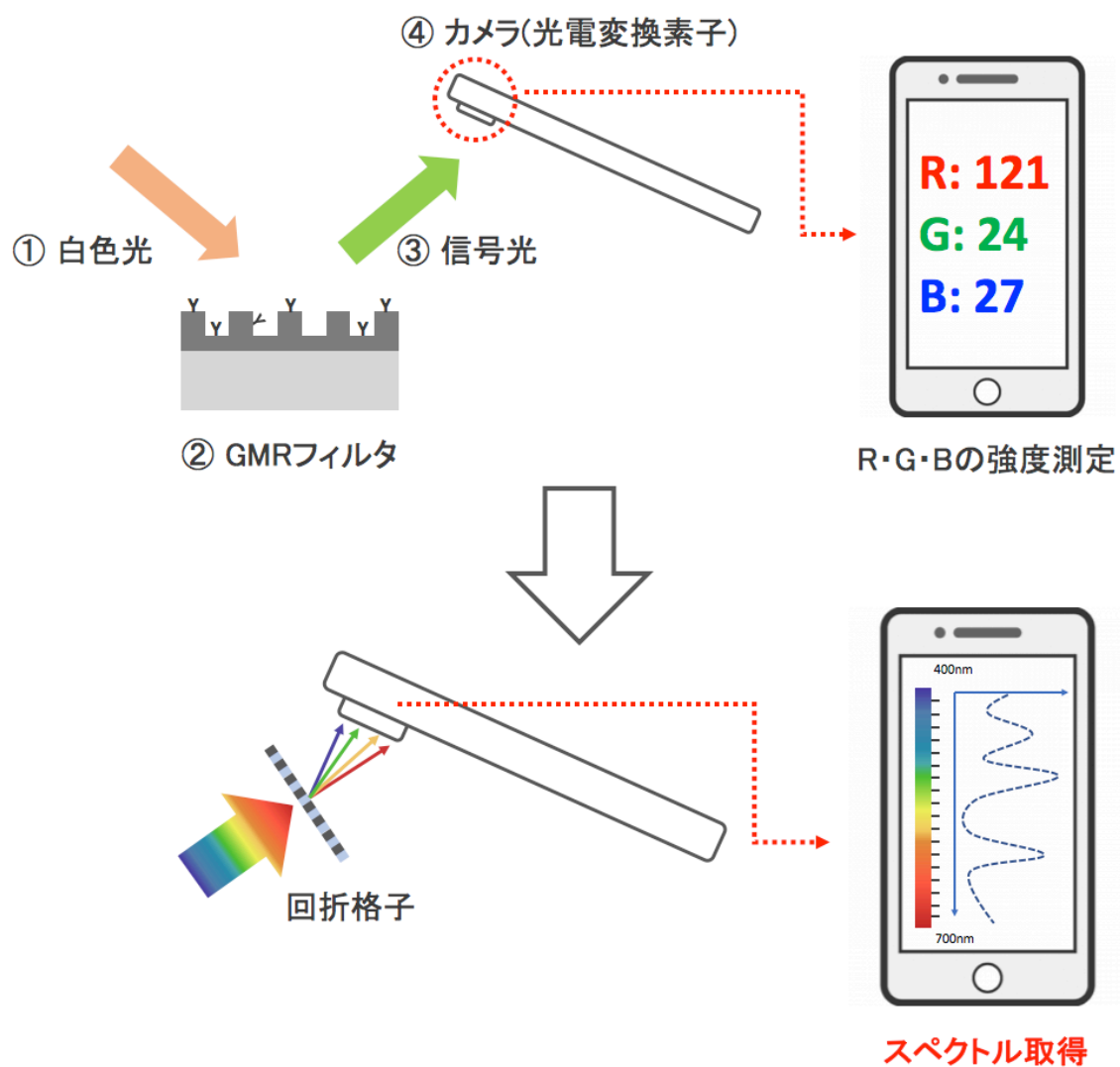


図 67 単純撮影とスマートフォン上でのスペクトル取得の違い

6.2. 携帯通信端末の世界における現状

6.2.1. スマートフォンの現状

近年、通信インフラの普及に伴い携帯端末の普及が飛躍的に進んでいる。2017 年地点における世界人口に対する携帯電話普及率は 104.49%となっており数字だけで見ると地球上の全ての人に携帯電話が普及していることを意味する[1]。この数字は今後も成長し、2020 年には契約数が 87 億 6924 万となり世界人口の 113.6%の契約数にまで及ぶと考えられている。携帯端末が普及する中で、近年ではスマートフォンと呼ばれる高機能な携帯型情報端末が登場し、国内外において急速に普及が進んでいる。スマートフォンはネットワーク機能やカメラ、Bluetooth 通信機能を搭載しており PC と遜色のない性能や機能を併せ持っている。2015 年地点におけるハンドセット(スマートフォンと従来の携帯端末)の出荷台数は 18 億 8124 万台と見込まれており、スマートフォンの出荷台数は 14 億 4411 万となっている。eMarketer が発表した調査[2]によると世界の人口におけるスマートフォンの普及率は 2014 年地点の 38.5%から 2020 年には 57.5%にまで上昇すると報告されており、今後も携帯通信端末はスマートフォンが主流となることは明らかである。

6.2.2. 途上国における ICT の現状

前項で示したように世界中で ICT の普及が急速に進んでいる。従来、先進国における普及が大多数を占めていたが近年では途上国においても ICT の普及が進んできている[3]。図 68 は住民 100 人あたりの携帯電話加入者数を示す。途上国の加入者数は 2005 年の段階では 100 人あたり約 23 契約となっているが、2014 年では 100 人あたり約 90 契約となっており大幅に普及が進んできていることが確認できる。この背景には、従来までスマートフォンを作製していたグローバル企業のみならず、中国の Xiaomi(小米)、インドの Micromax、アフリカの Mi-Fone などの企業が自国の市場に参加したことや、中古端末の普及が要因として挙げられる。アフリカのような低開発地域を多く抱えている新興国においても携帯電話の普及率は非常に高くなっている。

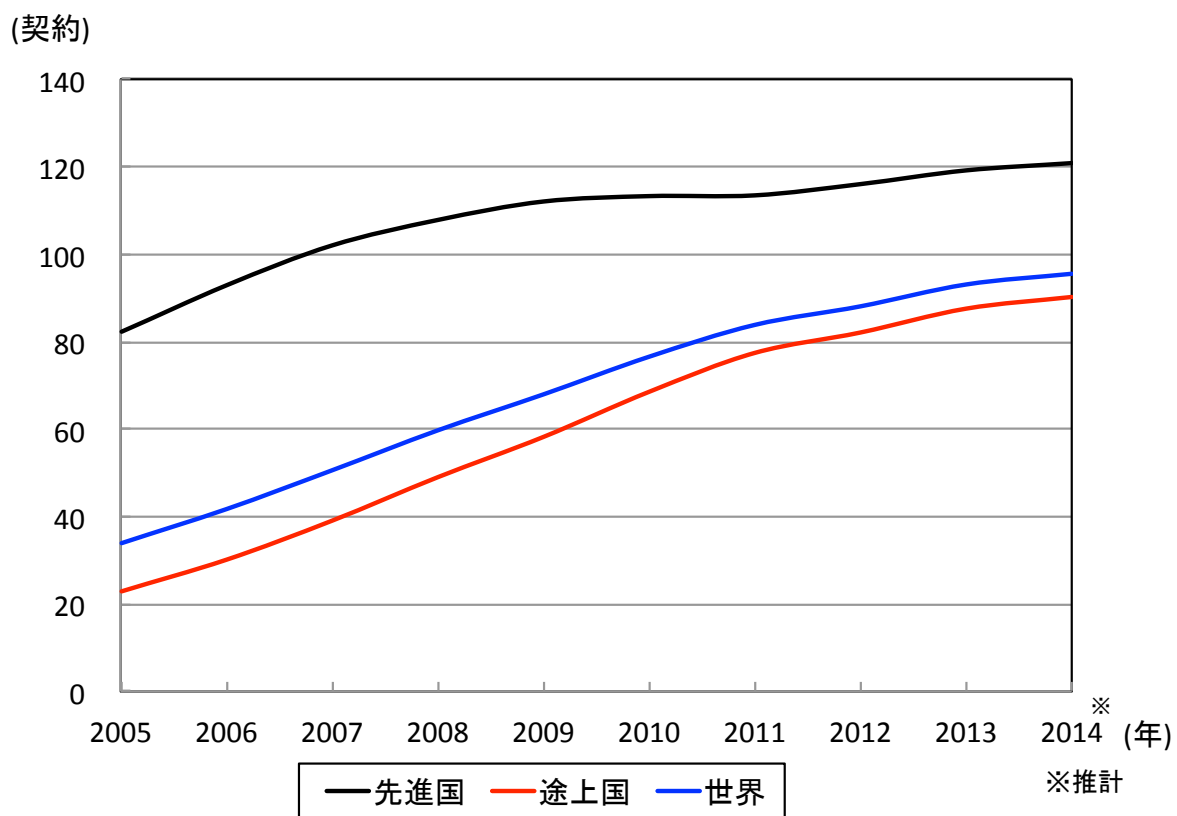


図 68 住民 100 人あたりの携帯電話契約数 [3]

6.2.3. 携帯通信端末のモバイルヘルスの応用

途上国での携帯通信端末の普及は連絡手段としての利用だけでなくモバイルヘルスの分野においても応用されている。主にアフリカにおけるモバイルヘルスの役割は大きな意義を有する。その一例として、携帯電話を用いた HIV の予防や対策に関する情報を提供するサービスが挙げられる[4]。

アフリカにおける HIV の感染患者は非常に多く、WHO の報告によると 2012 年における全世界の HIV 患者は 3530 万人であるが、サブサハラアフリカ地域だけで 2500 万人の感染患者がいる。これは、世界全体における HIV 患者の 71%が集中していることを意味する。医療の進歩に伴いエイズに伴う死亡者数は年々減少していく傾向であるが、一方で新規の感染者も多く存在しており予防や対策が進められている。そこで、急速に普及が進む携帯端末を活用するサービスが着目されており、モバイルヘルスとも呼ばれている。具体的には携帯端末にテキストメッセージや音声通話を活用して情報発信を行うなどのサービスがある。携帯通信事業者の業界団体(GSM Association)によると、開発分野における国際社会共通の目標であるミレニアム開発目標（Millennium Development Goals: MDGs）において 8 つの目標のうち以下の 3 つの目標でモバイルヘルスを活用することが期待されていると報告している。

1. 乳幼児死亡率の削減

2. 妊産婦の健康の改善

3. HIV/エイズ, マラリア, その他の疾病の蔓延の防止

スマートフォンの有する高度な情報処理機能やカメラに着目して、コロンビア大学の研究チームは感染症の診断ができるスマートフォンキットを開発したり、簡易なカメラアダプターを用いてスマートフォン上で眼の検査を行うことを可能にした“Peek”のようなプロジェクトも登場している[5-6]。これらの取り組みは、いずれも診断結果をリアルタイムで共有することが可能であるため、遠隔地から診察を行うことを可能とした(図 69)。すなわち、スマートフォンの普及に伴い従来の情報を患者へと発信するだけの状況から、患者自身が診断情報を取得し医師との情報共有ができるようになった。今後、予想されているスマートフォンの爆発的な普及に合わせて、スマートフォンを用いた POCT の仕組みや技

術を提案することでモバイルヘルスの充実が期待できる。上記の理由から、本研究ではスマートフォンを用いた医療診断システムを提案している。



図 69 スマートフォンを用いた Peek の遠隔医療診断技術：アフリカで取得したデータをロンドンの病院で解析する

6.3. スマートフォンを用いた分光分析システムの開発

6.3.1. 分光器の測定原理

分光器とは測定光を各色すなわち波長毎に分解した後に、各波長の強度を測定する装置である。測定光は通常、レーザー光源や LED などの特殊な単色光源を除いて実際には複数の波長の光の重ね合わせで構成されている。我々人間が感じる色とその成分であるスペクトルは大きくかけ離れている。、人間の目の感度応答に対応する赤・緑・青の三原色のそれぞれが足し合わさると我々人間は白色を知覚するが、分光器は厳密に赤・緑・青の 3 成分の波長のそれぞれの組み合わせである事を示す(図 70)。

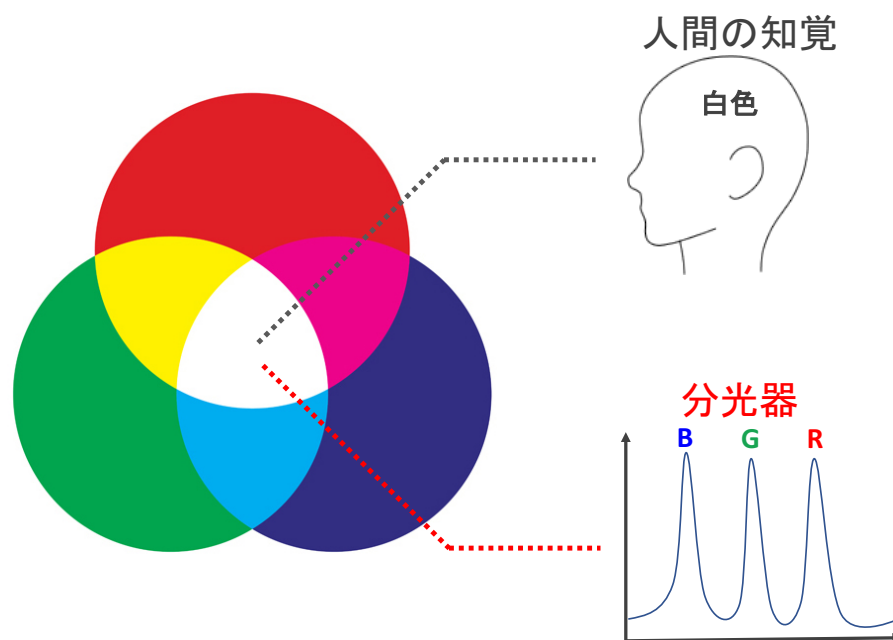


図 70 白色に対する人間の知覚と分光器で得られるスペクトル

図 71 は分光測定の実理を示す。分光分析を行うためには、まず初めに①測定光を②回折格子へと導入することで波長毎に分解する。この時、回折格子に入射した光は③グレーティング方程式を満たす形で回折光として分光する。[7]

$$\sin \alpha + \sin \beta = Nm\lambda$$

N は回折格子の本数、 m は回折次数、 α は入射角、 β は回折角をそれぞれ示す。すなわち、上式によると回折格子を透過する測定光は光の波長に応じて決まった角度で出射する事を意味する。一例として、スリット本数 500 本/mm の回折格子に光を入射させて、2 次回折光を観察すると 26 度の出射角度で 440nm の波長を持つ光が、49 度の出射角度で 755nm の波長を持つ光が現れることになる。

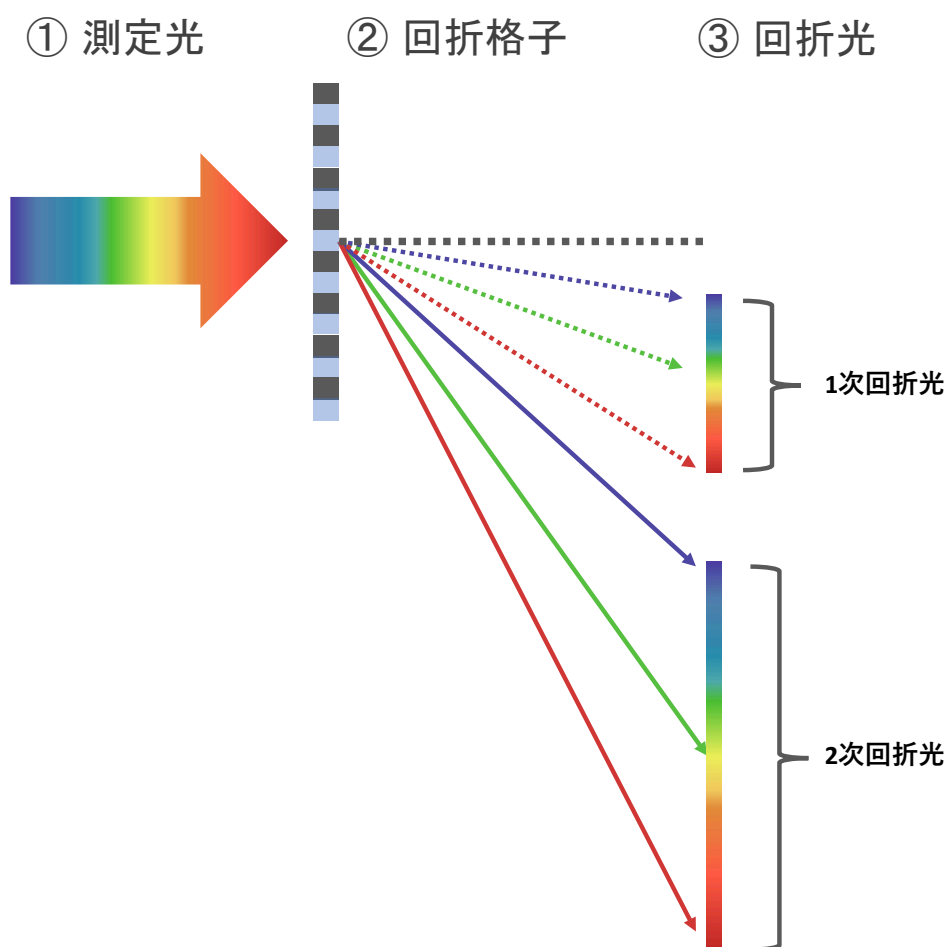


図 71 分光測定の実理

図 72 は分光器内の動作原理を示す．回折格子によって角度毎に分解された光は，CCD リニアイメージセンサのような光電変換を行う検出器上へと導入される．この時，アレイ状に並べられた各検出器の光強度を求めることで各波長に応じた光強度（分光スペクトル）が得られる．図 73 は CCD リニアイメージセンサの一例を示す．

上記で述べた手法では，一定の範囲の波長幅を一度に測定できるようになっており，これをポリクロメータと呼ぶ．対象的に単一波長を連続的に測定することで分光測定を行うものはモノクロメータと呼ばれている．

上記でも述べたように分光器は光電変換を行う必要がある．そのため，光電変換素子の性能・特性の影響を強く受ける．すなわち，素子の種類に応じて分光感度特性が大きく異なる事に注意する必要がある．一例として，900~2500nm のような近赤外線領域の光を分光測定する際には，検出器に InGaAs が用いられている分光器を選ぶ必要がある．

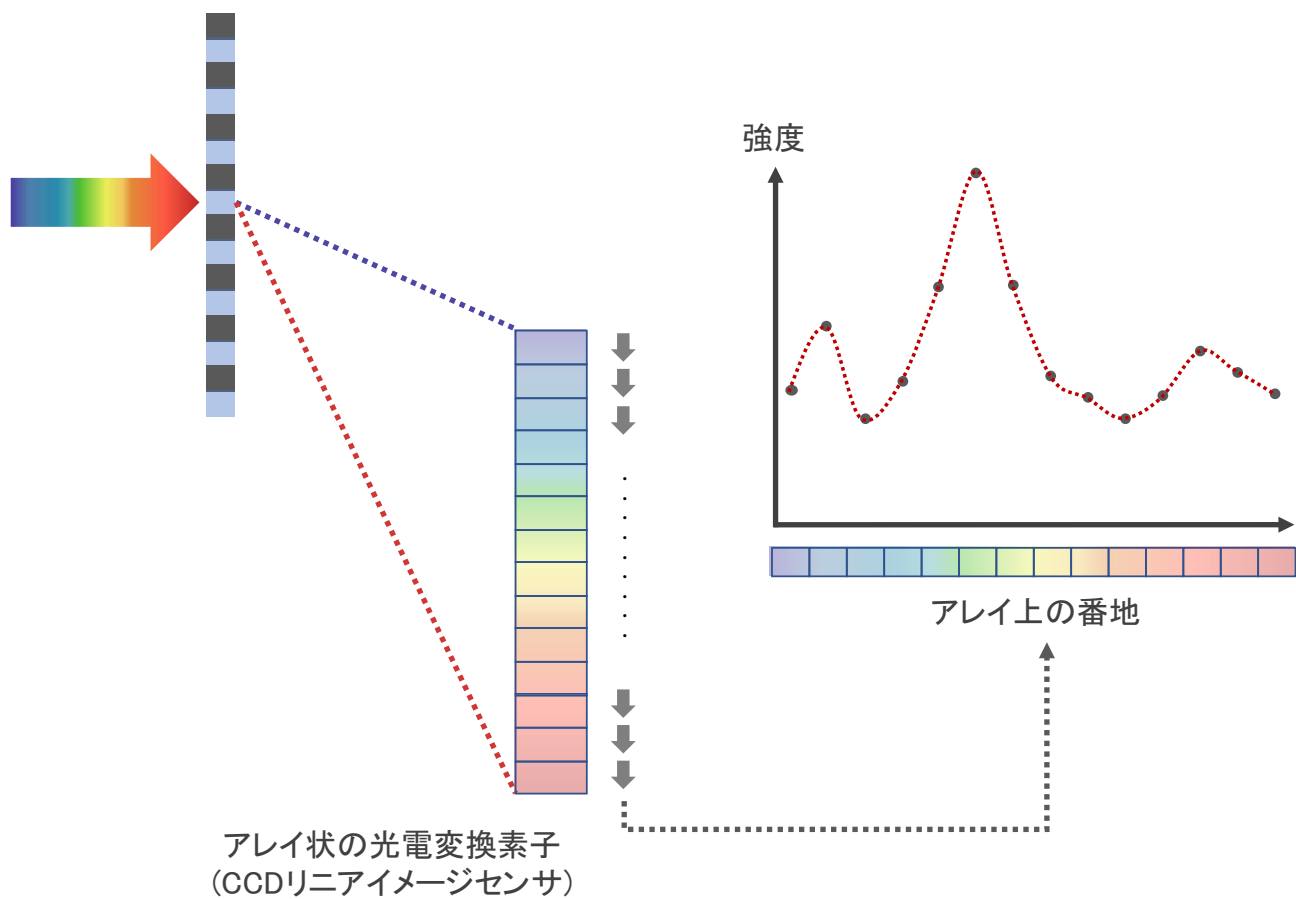


図 72 分光測定器内の CCD リニアイメージセンサを用いたスペクトルの測定

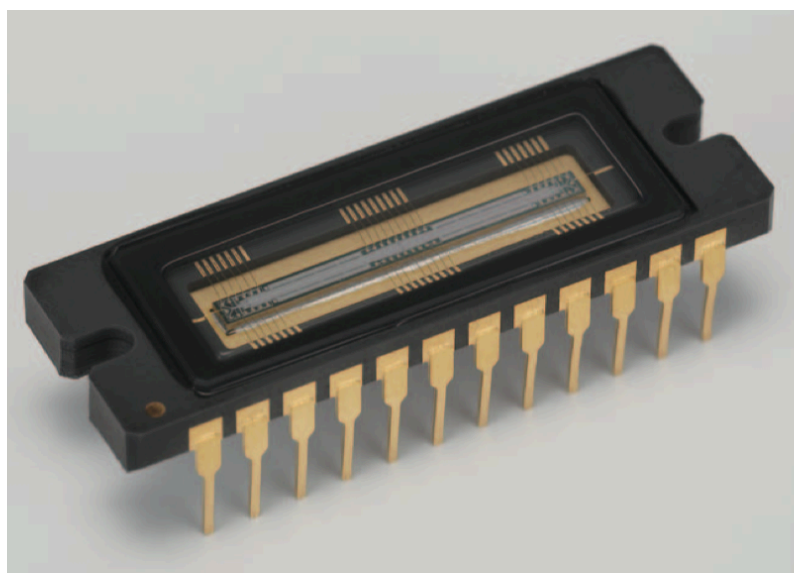


図 73 CCD リニアイメージセンサ：浜松フォトニクス社 S12379

6.3.2. 分光器アタッチメントの設計・作製

図 74 は iPhone 分光器の構成を示す．カメラの前に回折格子を配置することによって，回折光を iPhone 上のカメラ(CCD：厳密には CMOS イメージセンサ)で取得することが可能となる．すなわち，カメラの撮影機能を用いて分光イメージを得ることが出来る．得られた画像情報の各位置における光強度を求めることで，測定光の分光スペクトルが得られる．

上記の機能を実現させるために，図 75 に示すアタッチメントを設計した．アタッチメントは，入射スリットと回折格子挿入部，そして iPhone に固定するための固定部から構成される．波長分解能が良い 2 次回折光をカメラで取り込めるように，回折格子と iPhone のカメラの角度は 45° に設計した．

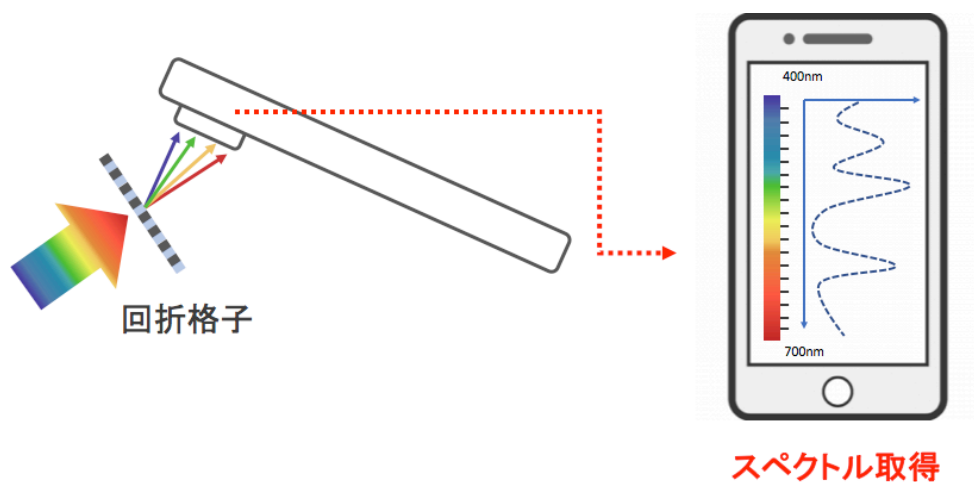


図 74 iPhone 分光器の構成図

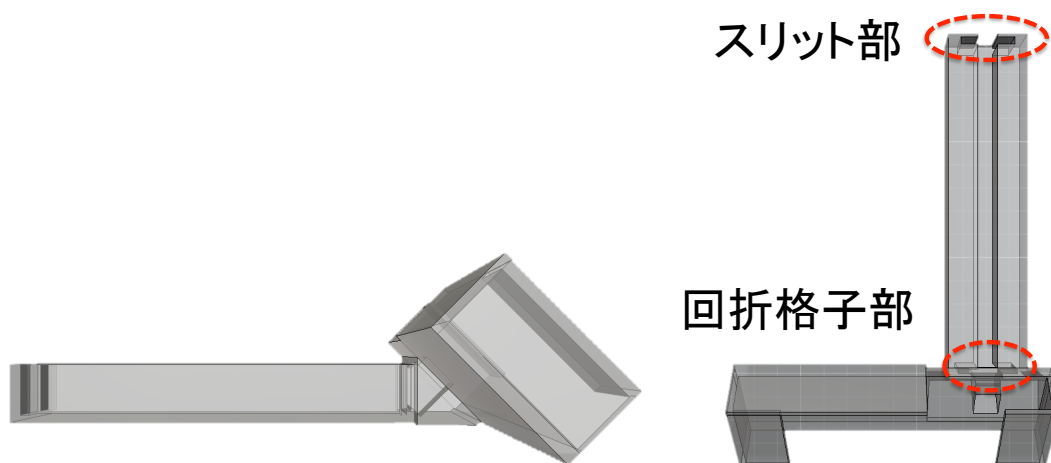


図 75 設計した iPhone 分光器アタッチメント(左図：側面図，右図：上面図)

図 76 は作製した分光器アタッチメントを iPhone に装着した様子を示す。アタッチメントの作製には 3D プリンター (Replicator 2X, Makerbot 社)を用いた。スリット部には直径 0.3mm のピンホール型スリットを用いた。回折格子部には、透過型の回折格子フィルム(透過型回折格子フィルム 1000GPM, Edmond Optics)を挿入している。

図 76 で見られるようにアタッチメントを iPhone5 に装着した状態で蛍光灯を観察すると、蛍光灯の光が波長毎に分解されている様子が iPhone の画面上で確認できる。加えて固定具を用いて iPhone を固定することで定点測定も行うことが可能である。



図 76 アタッチメントを用いた分光測定の様子

6.3.3. 解析手法

図 77 は分光分析を行うための手順を示す．大きく分けて 3 段階にプロセスは分けられている．はじめに，カメラ(CCD センサ)上から回折格子を通して回折された光の画像情報を取得する．光はレンズ，カラーフィルターを介して CCD 上に到達する．そして，CCD センサによって光電変換が行われた後にデータ値として情報が記録される．この時，R(Red)，G(Green)，B(Blue)の 3 種類の色情報にそれぞれ分かれている．輝度の情報を示すために，各々の色情報の値を以下の式で足し合わせることで輝度値が求められる[8]．

$$Y = 0.299 \times R + 0.587 \times G + 0.114 \times B$$

上記の計算を光の回折方向に従って行うことで，図で示すように CCD センサ上の位置に対する光強度が求められる．回折光の出射角度に対する波長はそれぞれ定められているため，図 78 で示す n 番目の位置から $n+1$ 番目の光強度は，短波長から長波長($-i$ 次の回折光では長波長から短波長)にかけての光強度を示す．すなわち，分光スペクトルが取得できることを意味する．本研究では上記の手法を用いて，分光スペクトルを取得する．図 79 は実例として作製したセンサからの反射光を測定した様子を示す．画面 Y 方向に分解される輝線中のある特定の位置で輝度が高い場所が見られる．この位置が共鳴波長に相当する位置(pixel position)となる．

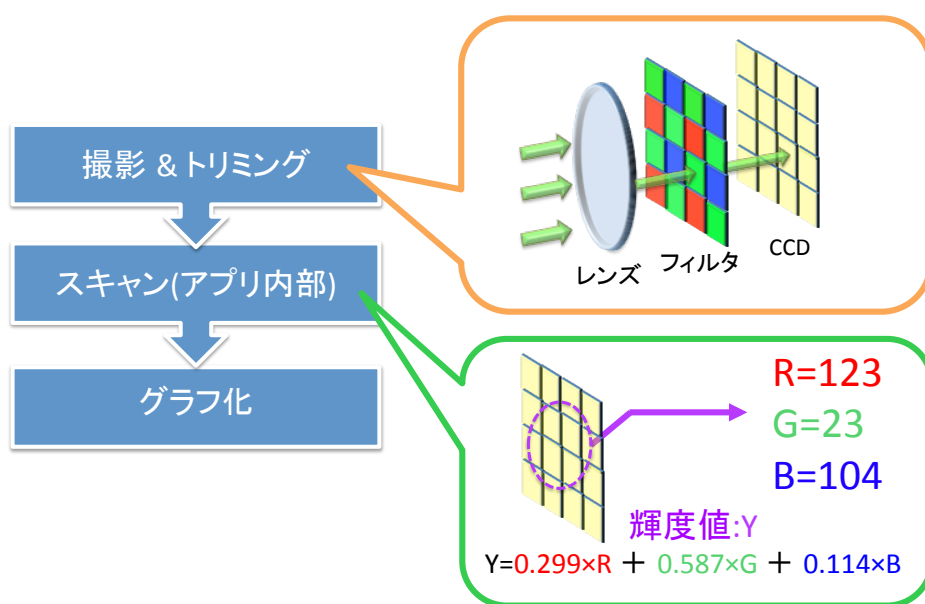


図 77 グラフ化までの流れ

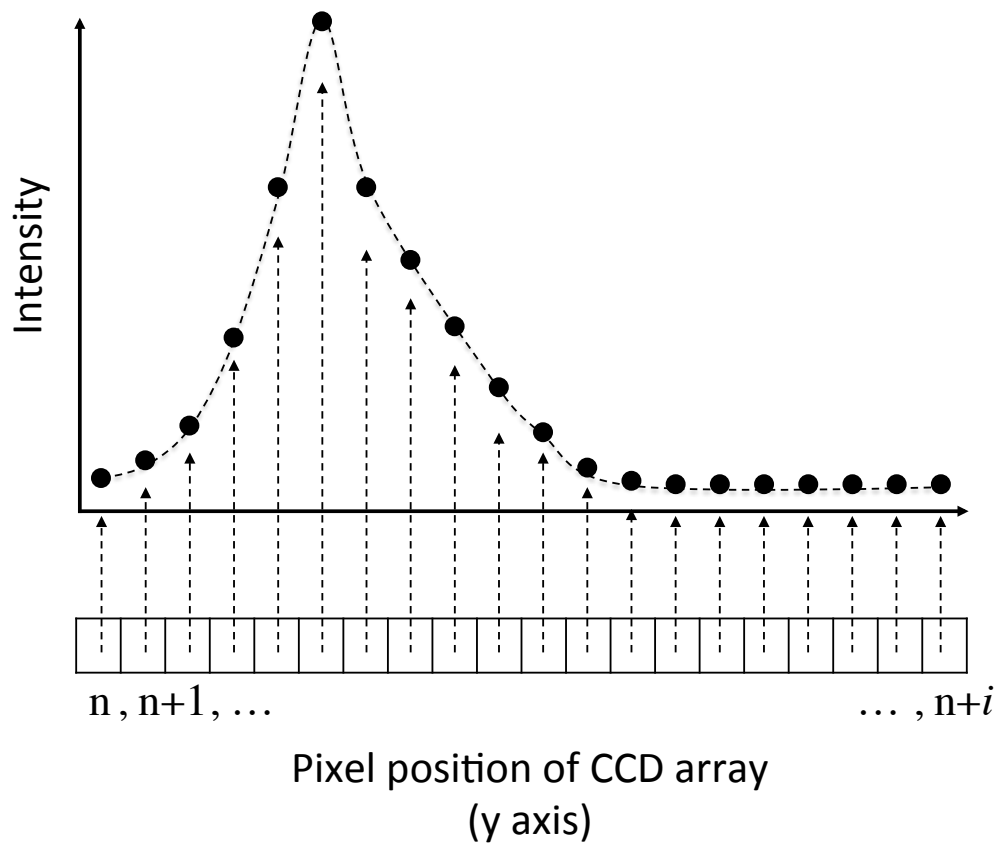


図 78 CCD 上の位置と光強度から算出する分光スペクトル

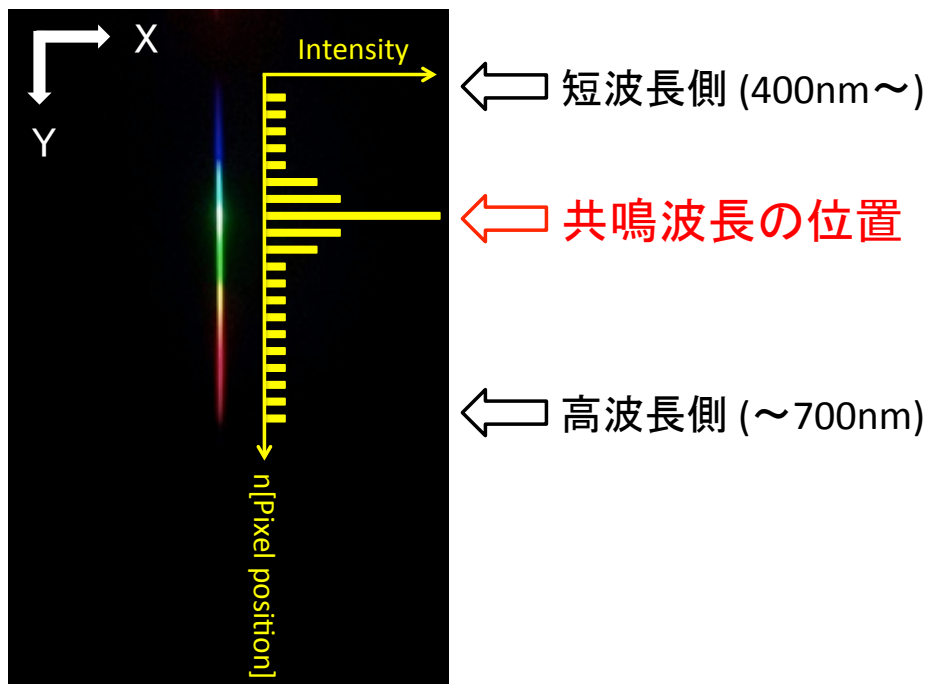


図 79 GMR フィルタからの反射光測定図：共鳴波長に対応する位置の輝度が高い

6.4. 実験方法

6.4.1. 屈折率変化の検出実験

図 80 はスマートフォン上で屈折率変化の検出を行うための実験系を示す．これまでに行った実験と同様，濃度を調整した NaCl 溶液をそれぞれ GMR フィルタ上に配置した時の反射波長を測定する．これまでに報告した実験では分光器を用いたのに対して，今回行う実験では作製した分光測定システムを用いて屈折率変化を検出する．流路に流す溶液試料は $n=1.333, 1.352, 1.368$ に調整した NaCl 水溶液をそれぞれ用いた．

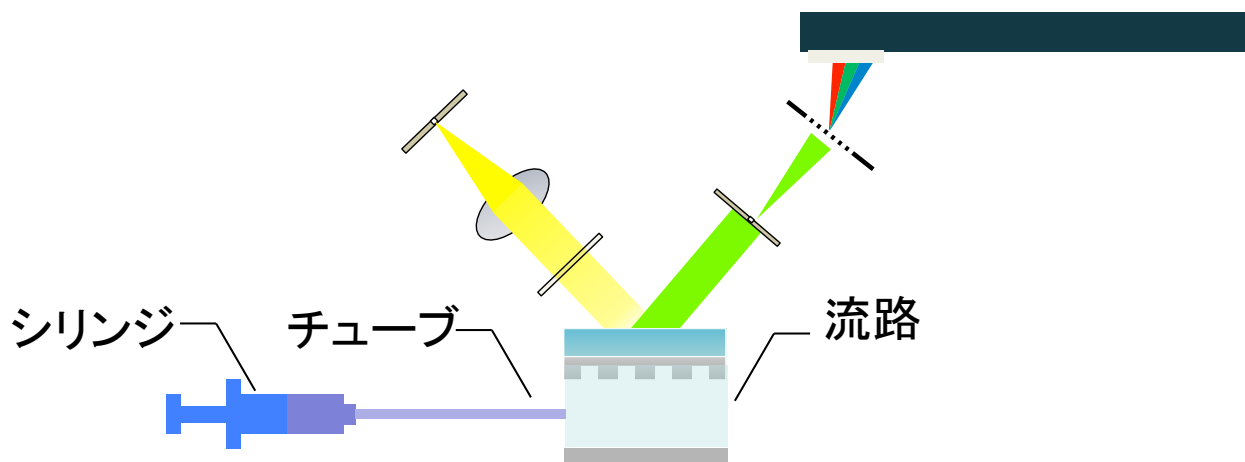


図 80 スマートフォン上での屈折率変化の検出

6.4.2. スマートフォンを用いた生体物質の検出

図 81 はスマートフォン上で生体物質検出を行うための実験系を示す．センサから出力される信号光を作製した分光測定システムを用いて解析する．実験条件は前章で述べた手法と全く同様の条件を用いており，センサ上に固定するアビジンの濃度を 100 nM から $200\mu\text{M}$ までの範囲で変化させた時の波長の変化量をスマートフォン上で測定した．実験系は，光路の途中にハーフミラーを挿入できるようになっており，分光器上でもスペクトルを取得して比較できるように工夫した．

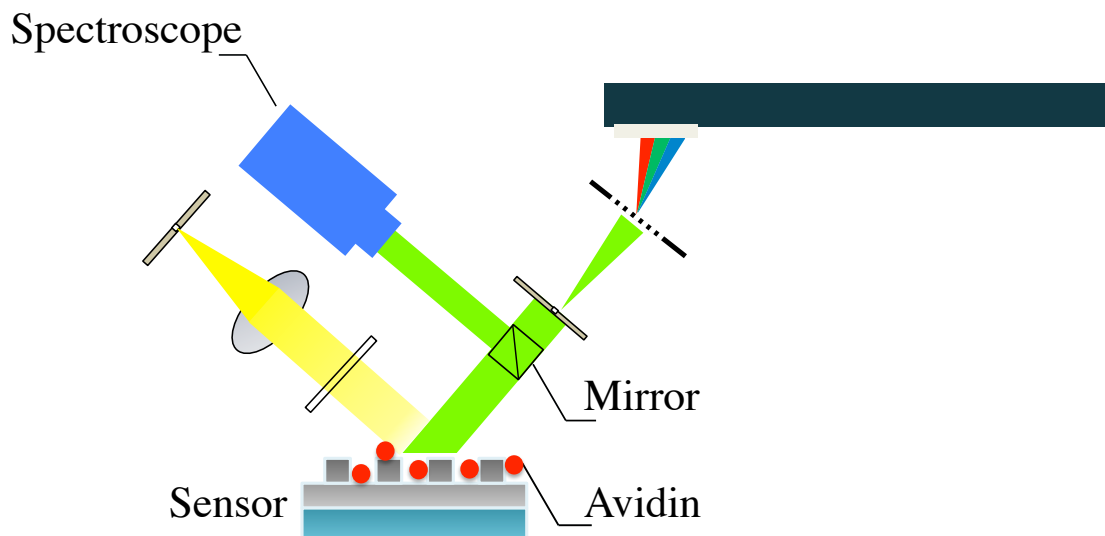


図 81 スマートフォンを用いた生体物質の検出

6.5. 実験結果・考察

6.5.1. 屈折率変化の検出

図 82 は iPhone 上で得られた屈折率変化の検出結果を示す。図 82 中のグラフの横軸はピクセル位置（≡波長），縦軸は正規化を行った強度を示す。用いた溶液の屈折率変化に伴い波形の場所がそれぞれ異なることが確認できる。ここで，波形の中で最も強度が高い位置をピーク位置（≡ピーク波長）と仮定すると，溶液の屈折率値が上がるにつれてセンサの共鳴波長は高波長側にシフトするという結果を示す。この結果は，5.4 節で得られた実験結果と対応している。これらの結果から，作製した分光測定システムを用いて屈折率変化の検出を行うことが可能であるといえる。

本実験結果を踏まえて，実際に生体物質を検出できるかどうかを考察する。予備実験で用いたそれぞれの試料溶液の屈折率の差は $\Delta n \approx 0.02$ であり，非常に微小な屈折率変化に対しても本システムを用いて検出することが出来ている。生体物質の屈折率は大きく，一例として研究検査で広く用いられているたんぱく質の 1 つであるアビジンの屈折率は $n = 1.45$ である[9-10]。PBS 等のバッファ溶液の屈折率は $n = 1.332$ 程度であることを考慮すると，アビジンの付着による屈折率変化は $\Delta n \approx 0.1$ 程度となる。今回の実験で用いた試料の屈折率変化と比較すると，およそ 5 倍の変化量に相当する。すなわち，今回作製した分光測定システムを用いて生体物質を検出できるという結果が示された。

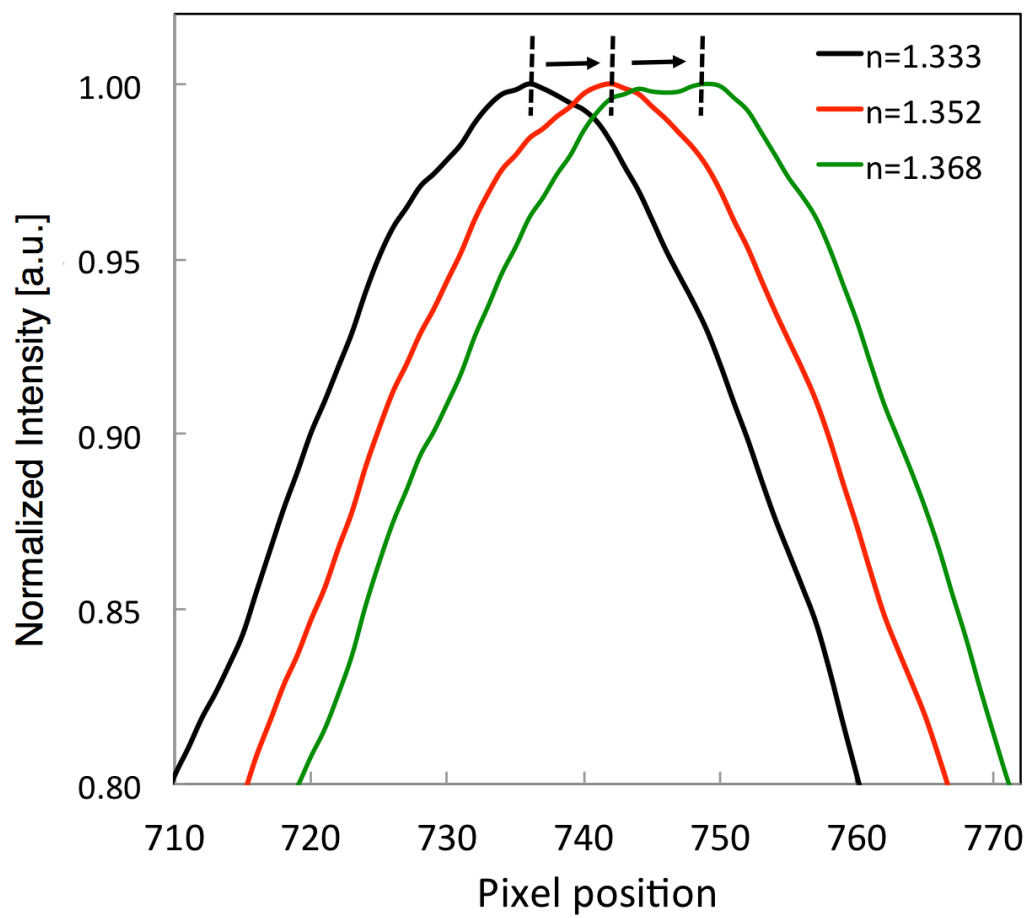


図 82 スマートフォン上での屈折率変化の検出

6.5.2. スマートフォンを用いた生体物質の検出

図 83 はそれぞれの分光器で取得したアビジン濃度変化に伴うピークシフト量を示す．スマートフォン上で得られたピクセルシフト量を波長シフト量に算出するために，ここでは，分光器で得られたデータを元にキャリブレーションして得られた 0.182 [nm/Pixel] を用いて算出した．いずれの分光器の測定結果も，濃度が上昇するにつれて変化量が大きくなることが確認できている．加えて，アビジン溶液の濃度が $100\mu\text{M}$ の時に変化量が飽和しており，双方の結果ともに変化量が一定値以上を示していない．すなわちダイナミックレンジの上限に達しているという現象についても，双方の分光器ともに示していることが確認できた．以上の結果から，作製した分光測定システムを用いてスマートフォン上で生体物質の定量検出が可能であるという結果が得られた．

実際に血液中から特定の生体物質を検出する際にはセンサ上への非特異吸着を抑制する必要がある．血中に含まれる生体物質の中でも特に考慮しなければならない物質としてヒト血清アルブミン (HSA) が挙げられる．HSA の役割は体内において生体物質を保持・運搬することである．HSA の表面は多種多様な生体物質を HSA 自身が保持するために生体物質が吸着しやすい構造となっている．従ってセンサ表面上に固定化された抗体あるいは抗原などの生体物質に対しても HSA が非特異的に吸着する恐れがある．そのため，血液を用いた検査を行う際には，前処理として (1) 注射器中にろ過フィルタを導入する，(2) 阻害剤を導入して HSA をキャッピングするなどの工夫が必要となる．

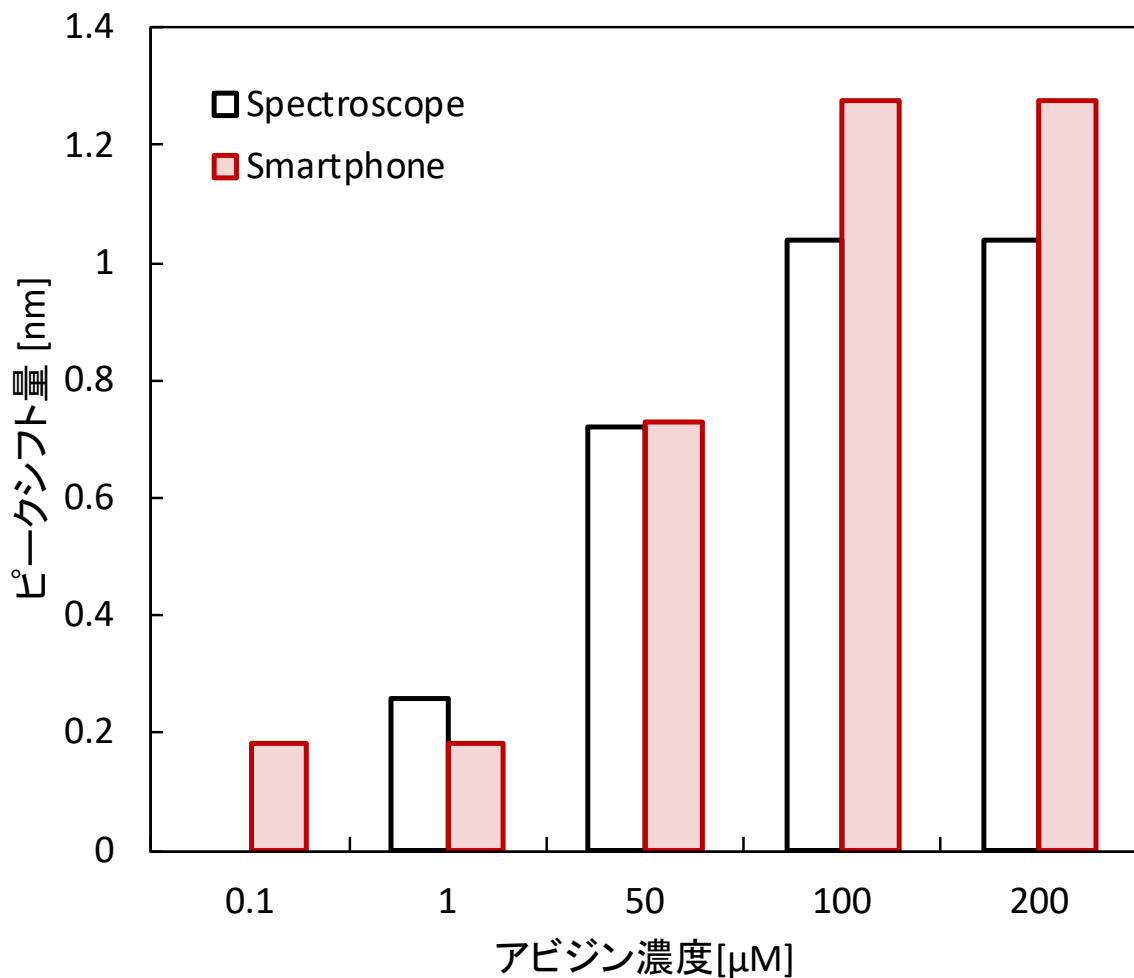


図 83 変化量の測定結果

次に飽和状態の時のピークシフト量 $\Delta\lambda = 1.04[\text{nm}]$ という結果について考察を行う．ここで飽和状態の時のセンサ表面を考えると，表面が一様にアビジンで覆われている状況であると仮定する．アビジンの大きさは， $5.6\text{nm} \times 5\text{nm} \times 4\text{nm}$ [11]となっており屈折率は $n = 1.45$ であると報告されている．ここでシミュレーションを行うために，図 84 で示す高さ 5nm ， $n = 1.45$ の生体膜層(Avidin layer)がセンサ表面に形成された状態のモデルを仮定しシミュレーションを行った．図 85 はシミュレーションで得られた結果を示す．シミュレーションの結果より， $\Delta\lambda = 1.693[\text{nm}]$ という結果が得られた．下記でも述べる実験とシミュレーション間における相違点より，実験で得られた値は妥当な値が得られたと結論づける．

実測値とシミュレーション結果の間における差の要因は、以下の3つの要因が考えられる。第一にアビジン等の生体物質がセンサ表面を余すことなく均一に付着しないこと、第二に作製したセンサ表面の形状は完全にシミュレーションの形状と同じものではなく、表面粗さや格子のエッジの形状などにおいて違いを有する。そして、第三の要因としては、入射角の条件がそれぞれ異なるという要因が挙げられる。実験では入射角を 50 度に設定して実験を行ったが、シミュレーションソフトウェア上では垂直入射の入射光でシミュレーションを行っている。特に第二、第三の要因はセンサ自体の屈折率変化に対する共鳴波長の変化量に影響を与えていると考えられる。既存の手法で用いたシミュレーション方法は、センサ設計の段階において非常に良好な結果を示すが、今回の実験のように角度を有する入射光を扱う場合において、より厳密なシフト量の変化を推定する時には RCWA 法などの他の手法を用いることが望ましいと考えられる。

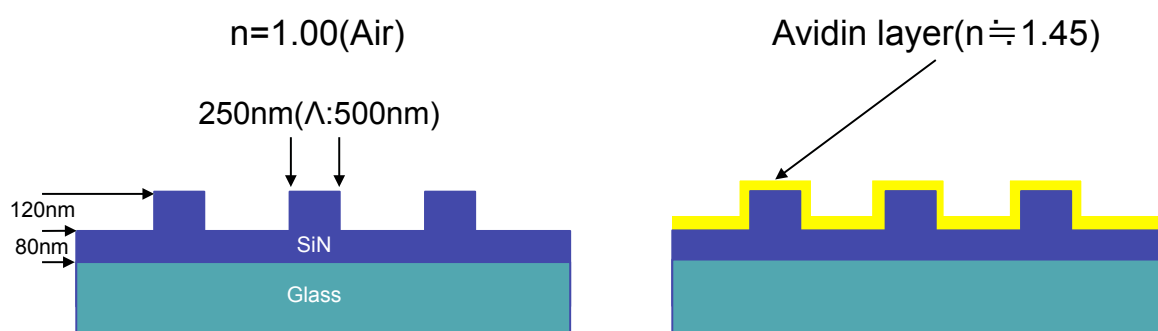


図 84 使用したシミュレーションモデル

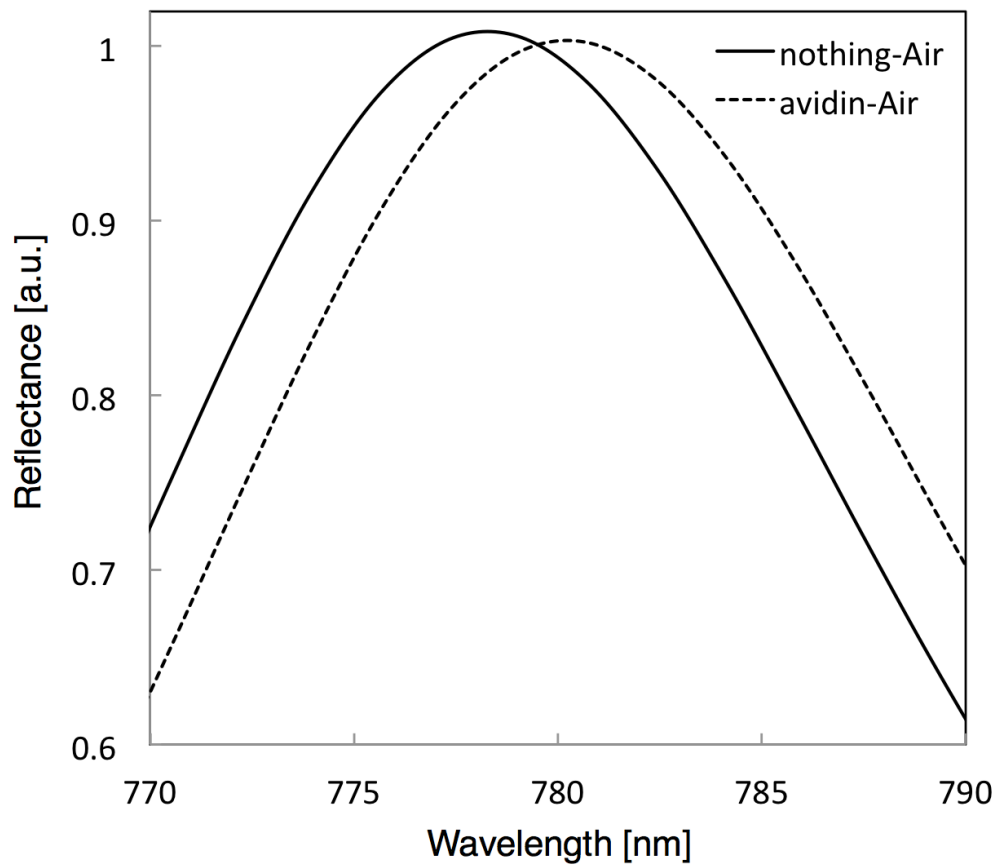
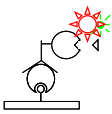

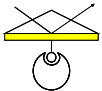

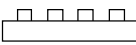


図 85 アビジンの有無による共鳴波長変化のシミュレーション結果

表 6 は提案手法と既存のバイオセンシング手法を示す。ELISA や SPR など高感度かつ定量検出が可能な手法は装置が大型であるため持ち運んで使用することが不可能である。これに対して本研究で提案した手法は(1)定量で検出することが可能、(2)持ち運びが可能であるという特徴をそれぞれ有している。一方で提案手法の課題として検出感度の低さが挙げられる。ELISA や SPR などの既存の手法では pg/mL オーダーの検出感度を有しているのに対して提案手法の検出感度は $\mu\text{g/mL}$ オーダーであり高感度化が求められる。提案手法において感度が低くなる最大の原因は、標的物質が溶液中に存在していてもセンサ近傍のごく一部の標的物質しか検出することができない事に起因する。これは、数十 nm 程度の物質は、液中において重力によって沈降する力に比べて熱運動による拡散が大きくなるためである。そこで、溶液中に分散している生体物質の高効率捕獲および捕獲物質の外部操作を行うことで高感度かつ高速なバイオセンシング手法が実現できると考えられる。

表 6 提案手法とバイオセンシング手法との比較

手法		感度	性質	検出用標識	サイズ	価格	検査時間
酵素結合免疫吸着法 (ELISA法)		pg/mL	定量	蛍光標識	大型	高価	数時間
イムノクロマト法		pg/mL (Yes / No)	定性	金粒子	超小型	低価格	- 30分
表面プラズモン共鳴 (SPR)		pg/mL	定量	ラベルフリー	大型	高価	リアルタイム
水晶振動子マイクロバ ランス法(QCM)		ng/mL	定量	ラベルフリー	大型	高価	リアルタイム
導波モード共鳴効果 (提案手法)		$\mu\text{g/mL}$	定量	ラベルフリー	小型	低価格	- 1時間

導波モード共鳴効果と SPR を用いたバイオセンシング手法をそれぞれ比較した際に、最も異なる点として(1)必要となるサンプル溶液の量、(2)装置全体の大きさが挙げられる。

SPR で測定を行う際には、信号が安定するまでサンプル溶液を流し続ける必要がある。従ってサンプル溶液を多量に準備する必要がある。一例として、上記で取り上げた Open

SPR™ を用いた測定では、最低でも 250 μ L 以上のサンプル溶液が必要である。これに対して GMR フィルタを用いたセンシング手法は測定に必要となるサンプル溶液が極少量で済む。実際に測定を行うために必要となるサンプル溶液は 5-10 μ L 程度で十分である。従って自己診断する場合など微量の血液で検査を行う場面においては GMR フィルタを用いたセンシング手法が有用であると考えられる。

次に装置全体の大きさについてそれぞれ比較する。SPR を用いたバイオセンシング手法を行うためには光学系や流路、ポンプが必要となるため装置が大型になる。近年では装置の小型化も進んでおり、Nicoya Lifesciences 社から提供されている Open SPR™ は 216 mm \times 150 mm \times 120 mm(全長, 幅, 高さ)まで小型化されている。しかし、PC や外部電源を必要とするため持ち運んで使用することは不可能である。これに対して、提案手法はスマートフォンやセンサ、光学系の部品を含めても 300g 以下と軽量であり持ち運びが可能である。そのため、POCT 用途においては提案手法が適していると考えられる。

6.6. サマリー

本章では、スマートフォンを用いた **GMR** フィルタから得られる信号解析手法を確立するために、測定器である分光器の測定原理・設計方法についてそれぞれ述べた。これらの設計手法に従って、実際にスマートフォン上で分光分析を行うためにアタッチメントを設計・開発した。最終的に、作製した分光分析システムを用いて **GMR** フィルタから得られる信号光の解析を行った。ここでは、従来行った実験と同様、(1)フィルタ表面上の屈折率変化、(2)生体物質の検出についてそれぞれ実証実験を行いスマートフォン上で取得したデータについても、分光器を用いる従来の実験と同様の測定結果が得られる事を実際に示した。これまでに得られた一連の結果より、提案手法が携帯型の定量検出手法として用いることが可能であることが示された。

6.7. 参考文献

- [1] THE WORLD BANK, “Mobile cellular subscriptions (per 100 people)”,
<https://data.worldbank.org/indicator/IT.CEL.SETS.P2>
- [2] eMarketer : “Smartphone Users and Penetration Worldwide, 2014-2020”
- [3] ITU 「Global numbers of individuals using the Internet, total and per 100 inhabitants, 2001-2014」
- [4] 情報通信総合研究所株式会社, “開発途上国における ICT 利活用の現況等に関する調査研究の請負,” (2014).
- [5] ScienceDaily, “HIV and syphilis biomarkers: Smartphone, finger prick, 15 minute diagnosis.” <http://www.sciencedaily.com/releases/2015/02/150204144517.htm>.
- [6] “Professional eye exams from a phone.”, <http://www.peakvision.org/>
- [7] 島津製作所株式会社, “回折格子方程式,”
<http://www.shimadzu.co.jp/products/opt/guide/03.html>.
- [8] “色空間の変換” ,
<http://w3.kcua.ac.jp/~fujiwara/infosci/colorspace/colorspace4.html>..
- [9] S. Mittler-Neher, J. Spinke, M. Liley, G. Nelles, M. Weisser, R. Back, G. Wenz, and W. Knoll, “Spectroscopic and surface-analytical characterization of self-assembled layers on Au,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 10, no. 9–10, pp. 903–916, (1995).
- [10] Brockman, Jennifer M., Bryce P. Nelson, and Robert M. Corn. "Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films." *Annual review of physical chemistry* 51.1, 41-63, (2000).
- [11] Orelma, Hannes, et al. "Generic method for attaching biomolecules via avidin–biotin complexes immobilized on films of regenerated and nanofibrillar cellulose." *Biomacromolecules* 13.9, 2802-2810, (2012).

7. 磁性粒子を用いた生体物質の高感度検出手法の確立

7.1. はじめに

これまでに(1)携帯型の装置での分析を前提とした、(2)検体の定量検出が可能であるバイオセンシング手法をそれぞれ実際に提案してきた。加えて、実証実験を通じて実際にスマートフォンのような携帯型の機器上で生体物質の定量検出が可能であることを示した。

その一方で、実際の医療診断を行う場面においては pg/mL オーダーに相当する極微量物質の定量検出が行える事が望ましい。本研究でバイオセンサとして起用した **GMR** フィルタは、原理的には極微量の変化であっても共鳴条件が変化している。ここにおける検出限界は測定器である分光器の性能に依存している。これに対して、検出限界をより高めるためには単純に分解能の高い分光器を用いることに加えて、**GMR** フィルタの屈折率応答に対する感度を向上させる手法の 2 つが存在する。**GMR** フィルタの研究分野においては、主に後者のアプローチに着目した研究が行われている。しかし現実問題として、提案された構造を実現するうえでのプロセスの最適化や実現が困難であるという課題を有している。

そこで本研究では、上記で示した課題を踏まえたうえで、より単純で複雑な工程を必要としない新たな高感度検出手法そのものを提案する。本章では、提案する高感度検出手法について述べた後に、実際に提案手法を用いた高感度検出手法について実証実験を行い提案手法の有用性について報告する。

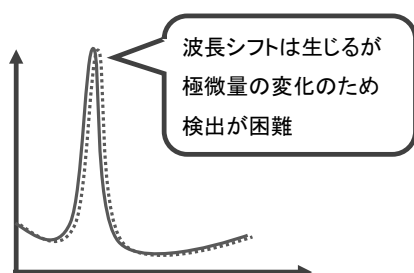
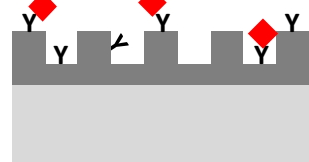
7.2. 高感度検出手法の提案

これまでに述べたように、薄膜のサブ波長格子パターンから構成される導波モード共鳴効果フィルタに白色光を入射すると特定の鋭いピーク波長のみ反射する[1]。この時、反射波長はセンサ表面上の屈折率に依存する。これらの特性から、導波モード共鳴効果フィルタは、カラーフィルタ[2-5]、イメージセンサ[6]のみならず、バイオセンサ[7-14]としても用いられている。上記の背景の下、近年ではバイオセンサ用途において **GMR** フィルタを用いた屈折率センサの感度を改善するための新しいアプローチが求められている。これまでも、Block らによる 1 次元の周期構造に低屈折率多孔質誘電体材料を組み合わせた検出感度の向上手法が報告されている[15]。Canalejas らは、金属材料を導波モード共鳴効果フィルタに組み込み、二次元のニトロイド型ナノピラー構造を形成することで屈折率変化に対する検

出感度が向上できることを報告している[16]. しかしながら, 従来の方法では, 材料の選択, 構造の幾何学的形状などの要素の最適化が必要であり, 特に実際の製造プロセス上における実現において課題が生じる.

そこで本研究では, 従来の導波モード共鳴効果フィルタを磁性ナノ粒子と組み合わせた, よりシンプルかつ効果的な感度の向上手法を提案する. 磁性ナノ粒子は, (1)生体分子の修飾が可能である, (2)外部磁場によって操作可能[17-18], (3)高屈折率を有するなどの特徴を有する. ここで, GMR フィルタを用いたバイオセンシングにおいて, 特に検出限界付近の濃度領域における現象に着目する. 従来のセンシング手法では, 検出限界付近の状態では生体物質はセンサ表面に結合しているものの, ごくわずかな波長シフトしか観測することができない. この状況に対して, 抗体が固定化された磁性粒子を追加で滴下・反応させると生体物質を介して磁性粒子が固定化される. この時, 磁性粒子の付着に起因する屈折率変化が生じることで追加のピークシフトが生じる. このピークシフトを検出することで, 低濃度の生体物質についても検出することが可能となると考えられる(図 86).

従来のセンシング手法



提案手法

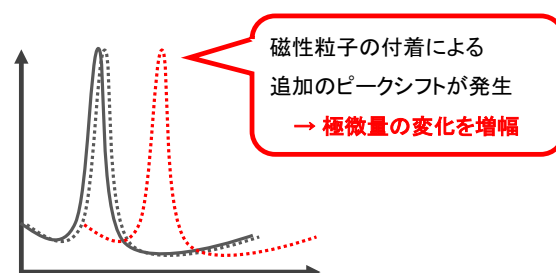
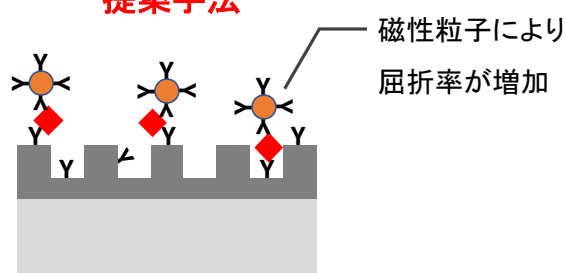


図 86 本研究で提案する磁性粒子を用いた高感度検出手法

7.3. 磁性粒子

7.3.1. 磁性粒子標識

図 87 は磁性粒子の模式図を示す。磁性粒子は主にポリマーで構成されており、ポリマー中に Fe_3O_4 などの微小な酸化鉄を有している。そのため、外部磁場によって磁性粒子を操作することが可能である。加えて、磁性粒子を構成しているポリマー表面には官能基を修飾することが可能である。そのため、官能基を介して抗体などのリガンドを固定化することが可能である。

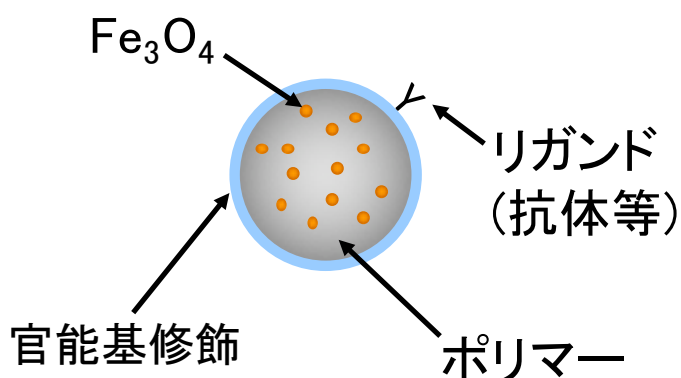


図 87 磁性粒子の模式図

磁性粒子は蛍光標識・酵素標識と同様に標識としても用いられている。磁性粒子をバイオセンシングに用いる利点として下記のものが挙げられる[19-20]。

1. 磁気信号は蛍光・発光・電気化学信号と比べて安定
2. 磁性体の物性は時間的に劣化しない
3. バイオ物質試料には干渉する磁場が存在しない
4. 磁界は試薬によってブロックされない
5. 磁性粒子は外部磁場により遠隔操作可能
6. 測定は少量で可能

抗体と抗原の反応を高感度に検出するためには、特に(1)磁気標識としての磁性粒子から発生する磁気信号が大きい事、(2)溶液中において凝集あるいは沈殿が発生しないことがそれぞれ求められる。

磁性粒子の磁気特性は磁性粒子の大きさに強く影響をうける．磁性粒子の粒径が小さいと磁気エネルギーが小さくなるため，熱雑音の影響を受けるようになる．すなわち粒子径が小さい場合には熱雑音の影響を受けて磁化の緩和現象が発生する．この緩和時間 τ は以下の式で与えられる．

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_b T}\right)$$

ここで， $\tau_0 = 10^{-9}$ [sec]は特性時間，特性時間 K は磁化を特定の方向に保つための磁気異方性エネルギー， V は磁性粒子の体積， k_b はボルツマン定数， T は絶対温度（一般的に室温）をそれぞれ示す．この式より磁性粒子の緩和時間は磁性粒子の体積に依存している．一例として，直径が $a = 15 \text{ nm}$ の Fe_2O_3 （マグヘマイト）を考える．マグヘマイトの異方性エネルギーは $K = 13 \text{ kJm}^{-3}$ であるので，この場合の緩和時間は $\tau = 2.6 \times 10^{-7}$ [sec]となる．すなわち磁化は極めて短時間で緩和してしまう．従って，上記の状態において磁性粒子は強磁性体としての性質を示さなくなる．すなわち常磁性体と同じ挙動・性質を示す．この時の状態を超常磁性体と呼ぶ．たんぱく質の磁気分離・精製などで用いられている市販の磁性粒子は，このサイズが一般的に用いられている．しかし，磁性ナノ粒子そのものから得られる磁気信号は非常に小さいため，磁気検出など直接的に粒子を検出する場合には，高感度かつ高精度な検出手法を用いる必要がある．この時，センサの駆動回路や電源，ロックインアンプなどの大型の装置が必要となる．

7.3.2. 磁性粒子を用いた生体物質の検出

図 88 は磁気的手法を用いた生体物質の検出手法を示す．バイオセンシングの手順を以下に示す．初めに一次抗体を固相基板の表面上に結合させる．次に標的物質（抗原）を固定化した抗体と特異的に結合させる．2次抗体を抗原に添加させた後に，磁性粒子を磁気的に誘導して2次抗体と結合させる．図 88 (a)の手法は ELISA で行われているプロセスと同じである．唯一異なる点は，磁性粒子を磁気的に誘導し2次抗体に結合させることによって標識添加時間を短縮できるという特徴を有する．

これに対して図 88 (b)で示す手法では，検出すべきバイオ物質と磁性ナノ粒子はあらかじめ2次抗体を介して結合されている．磁性ナノ粒子を使用しているので水溶液中の分散

性が良い事に加えて比表面積が大きいので溶液中において抗原と抗体の結合が効率良く行われる．溶液中の標的物質を高効率かつ高速に捕獲することが可能となるため，検出までに要する時間を大幅に短縮することが可能となる．

両手法とも抗原と抗体の結合反応を磁気標識から得られる磁気信号を磁気センサで読み取る形で定量検出する．

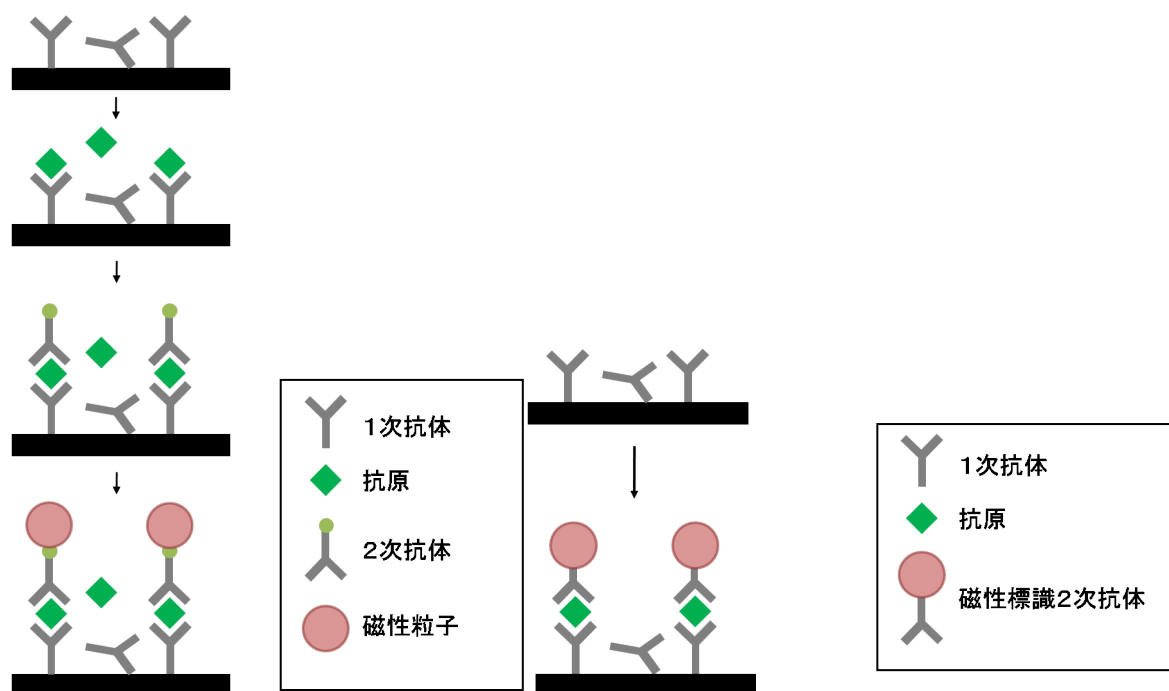


図 88 磁気的手法を用いた生体物質の検出の模式図

シグナルである磁性粒子の検出や測定には、主に磁気センサが用いられる。磁気センサと他のセンサの違いは検出対象が磁気である点である。そのため、磁気効果により、磁気－電気信号間の変換が容易に出来るという特徴を有している。磁性粒子を検出するための磁気センサとして、SQUID や巨大磁気抵抗素子 (Giant Magnetoresistance : GMR), ホール素子を用いた手法が提案されている。

しかし、その一方でナノサイズの磁性粒子を検出する場合、(1)粒子から発せられる磁場が極微量であり S/N 比が悪く検出が困難、(2)駆動回路の発熱によってタンパク質の変性が生じる等の課題を抱えていた。加えて本研究でも着目している POCT の実現においては、磁性粒子の検出システムを構成するうえで、ロックインアンプや冷却機構などの大型の装置が必要である事も大きな課題であった。これに対して本研究で提案する導波モード共鳴効果を用いたセンシング手法では、磁性粒子標識を磁気ではなく、磁性粒子を構成するポリマーに起因する屈折率変化として検出している。そのため、従来まで必要であった駆動回路や冷却システムを一切必要としないという特徴を有する。これは、本研究の目的でもある携帯型の医療診断装置を開発するうえで特に重要な観点である。

7.4. 実験方法

7.4.1. 化学結合を用いた磁性粒子の固定化実験

センサ表面は以下のプロセスで化学修飾を行った。最初に、センサー表面を硫酸と過酸化水素の混合物で 10 分間洗浄し、超純水ですすいだ。その後、プラズマで 1 分間処理し、表面にヒドロキシル基 (-OH) を露出させた。次に、センサー表面を無水エタノール中の 3-アミノプロピントリエトキシシラン (APTES, Sigma-Aldrich) の 5% 溶液に室温で 10 分間浸してアミン基 (-NH₂) を導入した後に、基材を乾燥エタノールおよび超純水で十分にすすいだ。最後に、ホットプレート上で 110°C で 10 分間アニールしてアミノ基を安定化させた。本実験では、粒子の固定化前の基準波長はこの処理の直後に測定したものとする。

図 89 は本実験で使用するセットアップを示す。

シラン処理後、130nm のカルボキシル末端化 MNP の溶液をチャンバー内にピペットで移し、センサー表面上に固定化した。その後、試料を超純水でリンスした後に乾燥させた。

本実験では、測定中に反射波長シフト量が最大となる必要な最適時間（反応時間）と粒子濃度を求める。反応時間は、磁性粒子溶液をセンサー表面へと滴下した直後から、超純水を用いてセンサー表面をすすぐまでの時間としている。

PWV シフトが飽和するまでの時間を決定するために、3% (1.05×10^{11} 個/mL) の磁性粒子溶液を用いて 30 秒～30 分間の範囲でそれぞれ反応させた時の反射波長シフト量を測定した。本実験では磁石 (0.74T) を用いて磁性粒子をセンサ表面上にまで誘導した場合と誘導しない場合の 2 種類の条件下を比較した。

さらに、0.5～3% 濃度の MNP 溶液をセンサ上に滴下し、5 分間放置してから脱イオン水ですすいだ。各 PWV 測定は試料を乾燥させた後に行った。

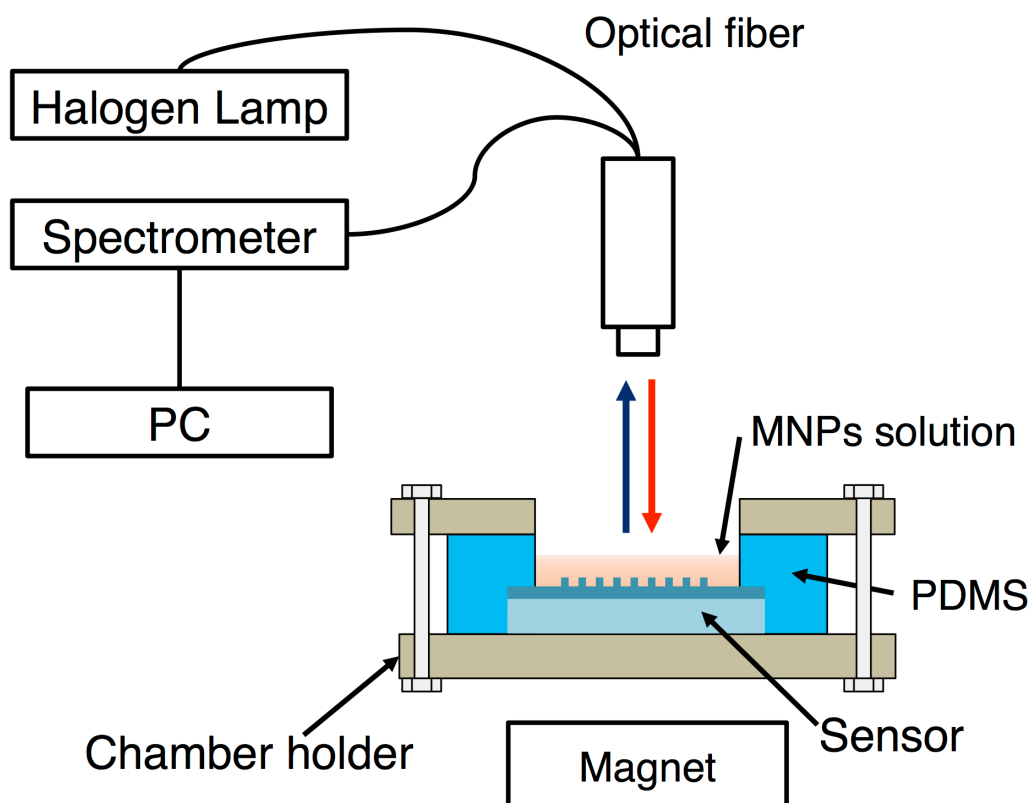


図 89 PDMS チャンバーを用いた磁性粒子の結合特性の測定系

7.4.2. 磁性粒子を用いたストレプトアビジンの高感度検出

磁性粒子を用いた生体物質の高感度検出手法の実証実験として、従来と同様、アビジン—ビオチン結合を用いる。図 90 は導波モード共鳴効果を用いたセンサの高感度化原理を示す。アビジンがビオチン処理されたセンサ表面上に固定化されるとセンサ表面上の屈折率は高くなるため、図 90 (a)に示すようにアビジンの吸着に起因するピークシフトが生じる。その後、ビオチンが修飾された磁性粒子溶液をセンサ表面上に滴下する。この時、ビオチン修飾磁性粒子はセンサ表面上に予め固定化されていたアビジンを介してセンサ表面上に固定化される(図 90 (b))。磁性粒子がセンサ表面上に固定化されることでセンサ表面上の屈折率は変化する。すなわち、磁性粒子による追加のピーク波長シフトが生じることが予測される。本実験では、上記のアイディアを検証するために下記の 2 種類の条件で実際に検証実験を行いそれぞれ比較した。

1. 400 nmol/L の濃度に調製したアビジンが固定化された時のシフト量
2. 上記のアビジンがセンサ上に結合した後に 5 % (1.75×10^{11} 個/ml)の濃度で調製した粒径 130 nm のビオチン修飾磁性粒子を滴下・反応させた時のシフト量

以下に実験条件の詳細を述べる。まずはじめに、センサ表面にビオチンを修飾する。前項と同様の条件で APTES を用いてアミノ基をセンサ表面に修飾した後に、1mmol/L の濃度で調製した NHS-biotin 溶液 ((N-Succinimidyl D-Biotinate, Tokyo Chemical Industry)) にオーバーナイト・室温条件下で浸す。この時、NHS-biotin 溶液の溶媒にはジメチルスルホキシド(DMSO, Wako)を用いた。溶液中で反応させた後に超純水で洗浄して乾燥させた。

センサ表面にビオチンを修飾した後に、400 nmol/L に調製したアビジン((Avidin from egg white, Sigma Aldrich, MW = 15,968 Da))溶液 50 μ L をセンサ表面上に滴下して室温下で 30 分反応させた。この時、溶媒には PBS(pH 7.4)を用いた。

次いで磁性粒子の非特異吸着を抑制するために BSA(Albumin from Bovine Serum, Wako))を用いたブロッキングを行う。アビジンを基板に固定化した後に、0.5wt%, PBS 溶媒で調整した BSA ブロッキングバッファー溶液中に冷蔵庫(4℃)の環境下で 30 分間反

応させた。ブロッキング処理を行った後に、PBS-T (PBS with 1 % Tween20, Wako)溶液を用いてセンサを洗浄した。

ブロッキング処理を行った後に、5%濃度に調製したビオチン修飾磁性粒子を 50 μ L センサ表面上に滴下して 5 分間反応させる。この時、センサの下部に磁石(0.74 T)を配置して溶液中の磁性粒子をセンサ表面上に誘導した。最終的に PBS-T および超純水をそれぞれ用いて洗浄した後に反射波長の変化量を測定した。

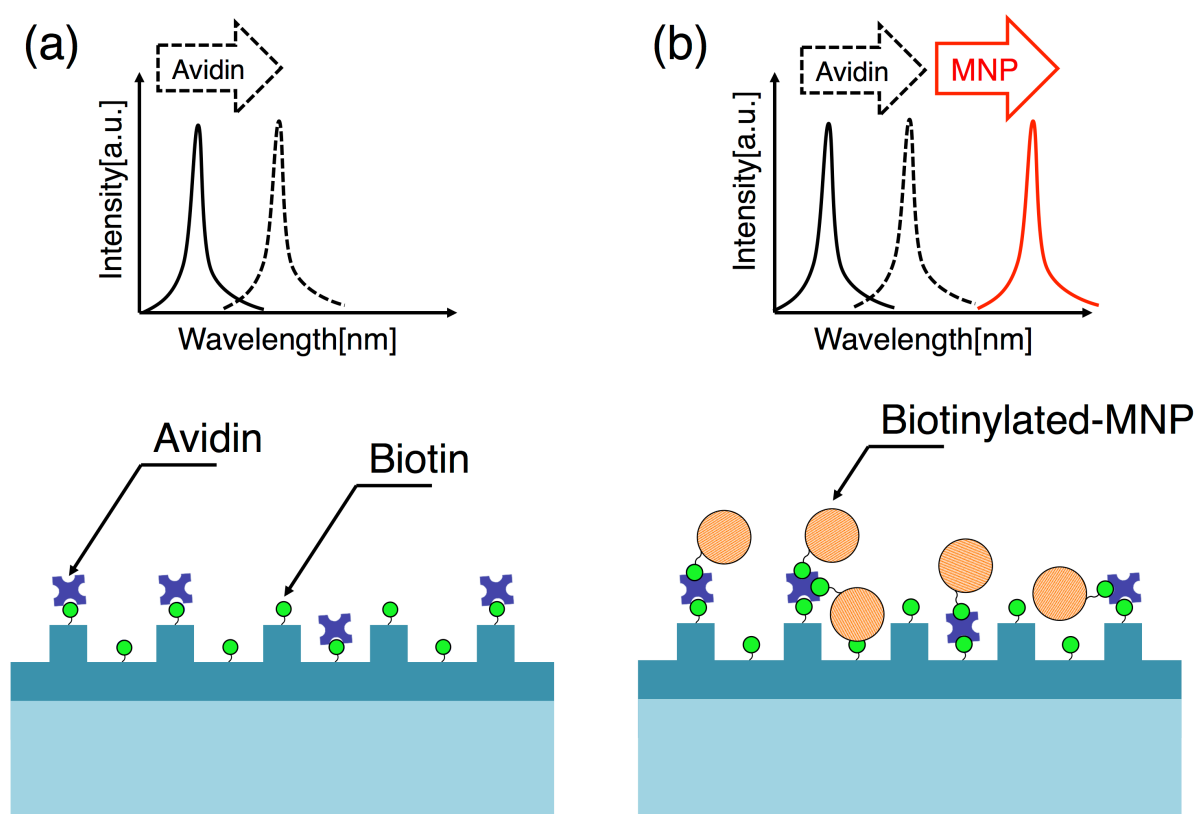


図 90 磁性粒子を用いた高感度検出手法の原理.

(a) アビジンのみの結合; (b) 磁性粒子の吸着に伴うシグナルの増幅.

7.5. 実験結果・考察

7.5.1. 化学結合を用いた磁性粒子の固定化

図 91 は磁性粒子溶液の濃度の変化に伴う波長シフト量の変化を示す．全ての濃度において微小な波長シフトが生じる結果が得られた．加えて，磁石の有無に限らず一定のシフト量が生じた．この現象が生じた原因としてセンサ表面と磁性粒子の間に生じた静電引力が寄与していると推測している．シラン処理を施したセンサ表面は NH_3^+ イオンが生じる一方で，磁性粒子はカルボキシ基が修飾されているため，溶液中において COO^- イオンが生じる．これにより，センサ表面近傍に位置する一部の磁性粒子が表面に結合したものと考えられる．その一方で，磁場を印加して磁性粒子をセンサ表面に誘導した際には，全ての磁性粒子濃度において大幅にピークシフトが増大することが確認できた．

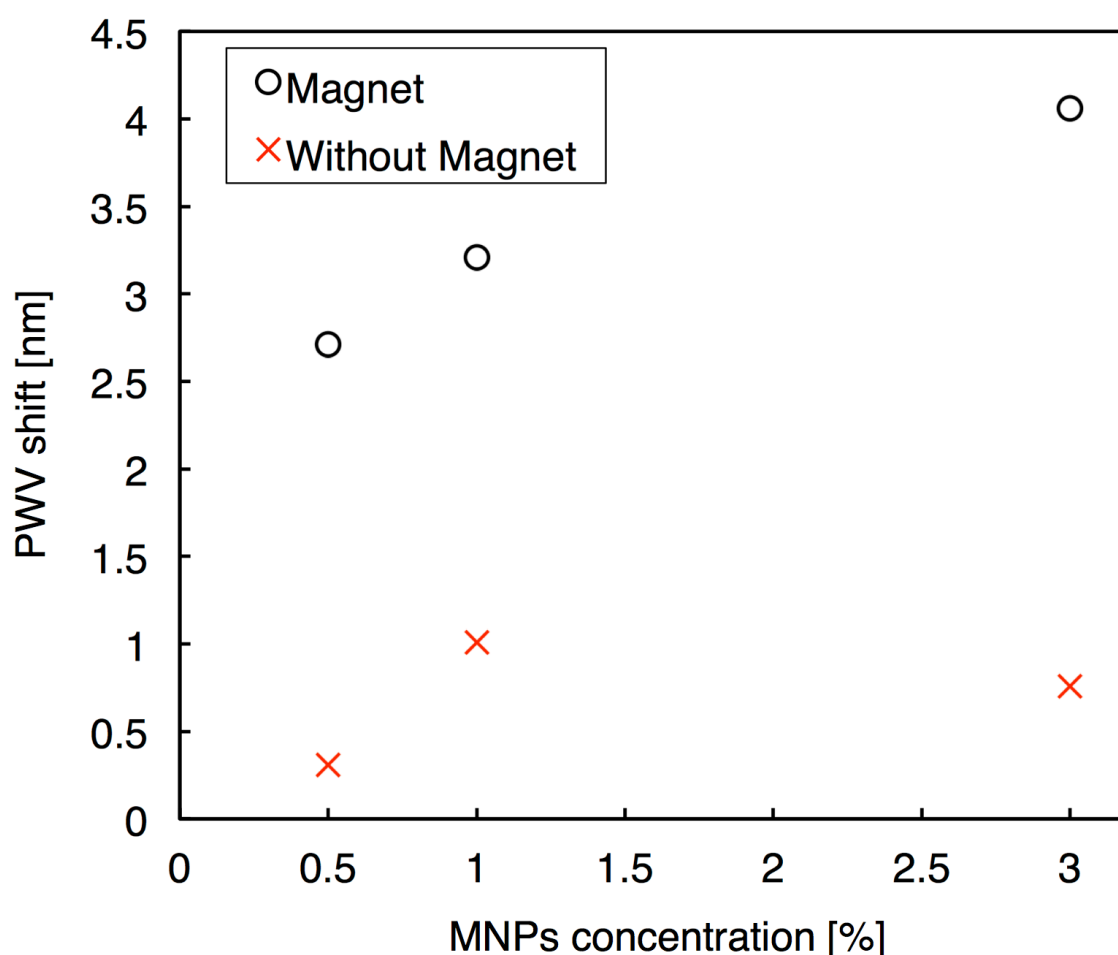


図 91 磁性粒子濃度および磁石の有無に伴う波長変化量の測定結果

本実験において、磁性粒子の固定化に関して磁性粒子の固定化に関して時間依存性を測定した。図 92 は磁場の印加時間に伴う波長変化量を示す。実験では磁石がある場合とない場合の 2 種類の条件で行った。今回行った実験条件下において、外部磁場を印加すると約 5 分の反応時間で波長シフト量が飽和することが示された。

その一方で、磁石を用いなかった場合には磁場を印加する時間の影響は受けておらず、反射波長シフト量は 0.76nm から 1.59nm の範囲で不規則的に得られる事が分かった。この現象については、前回の実験でも述べた現象と同様、センサ近傍の磁性粒子がセンサ表面上に惹きつけられた事に起因すると考えられる。あくまで、センサ近傍の磁性粒子のみが波長シフトに寄与するため、時間の経過の有無に関わらず一定以上のシフト量を示さなかったと考えられる。

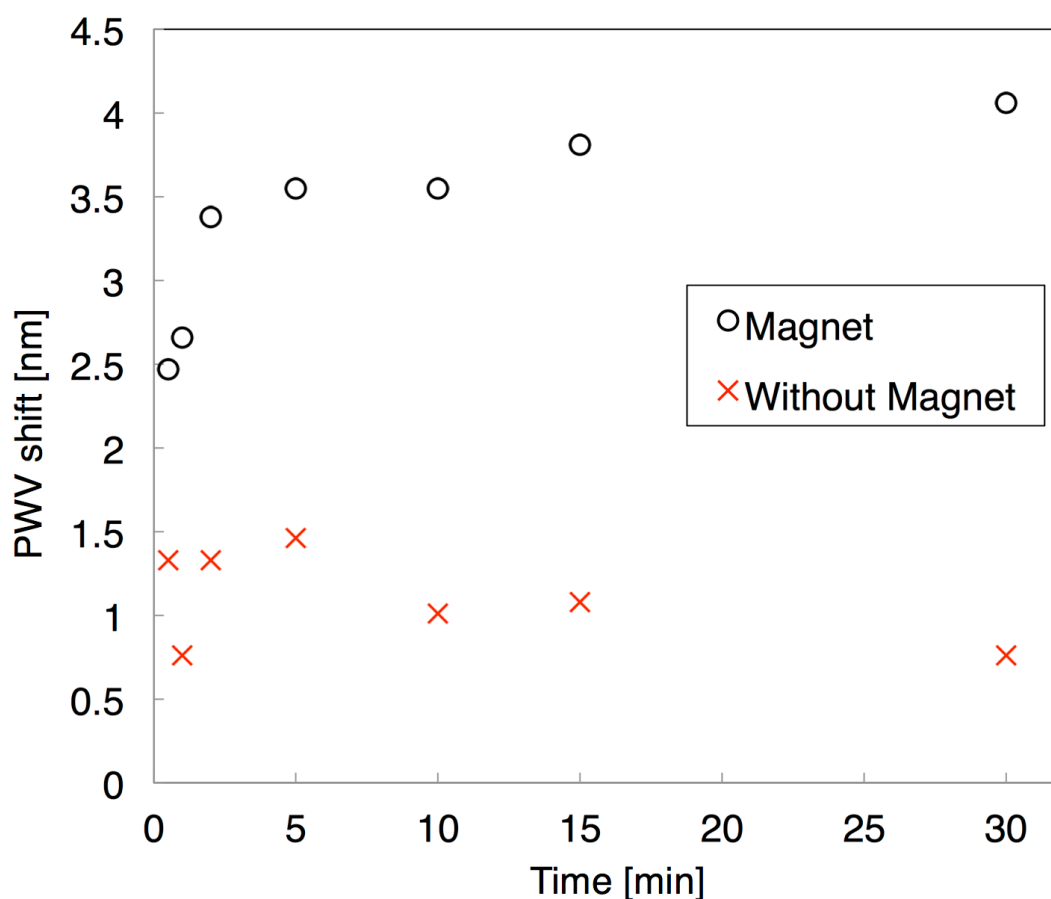


図 92 誘導時間に伴う波長変化量の測定結果

図 93 は磁性粒子溶液濃度が 3%かつ、磁石を用いてセンサ表面上に磁性粒子を固定化した際の電子顕微鏡像を示す．図 93 で示されているように、グレーティング構造上の表面全体に磁性粒子が均一に固定化されている事が確認できる．観察像の結果は、磁性粒子溶液の濃度が 3%かつ 5 分の反応時間で反射波長シフト量が飽和するという結果と十分に一致する結果が得られた．

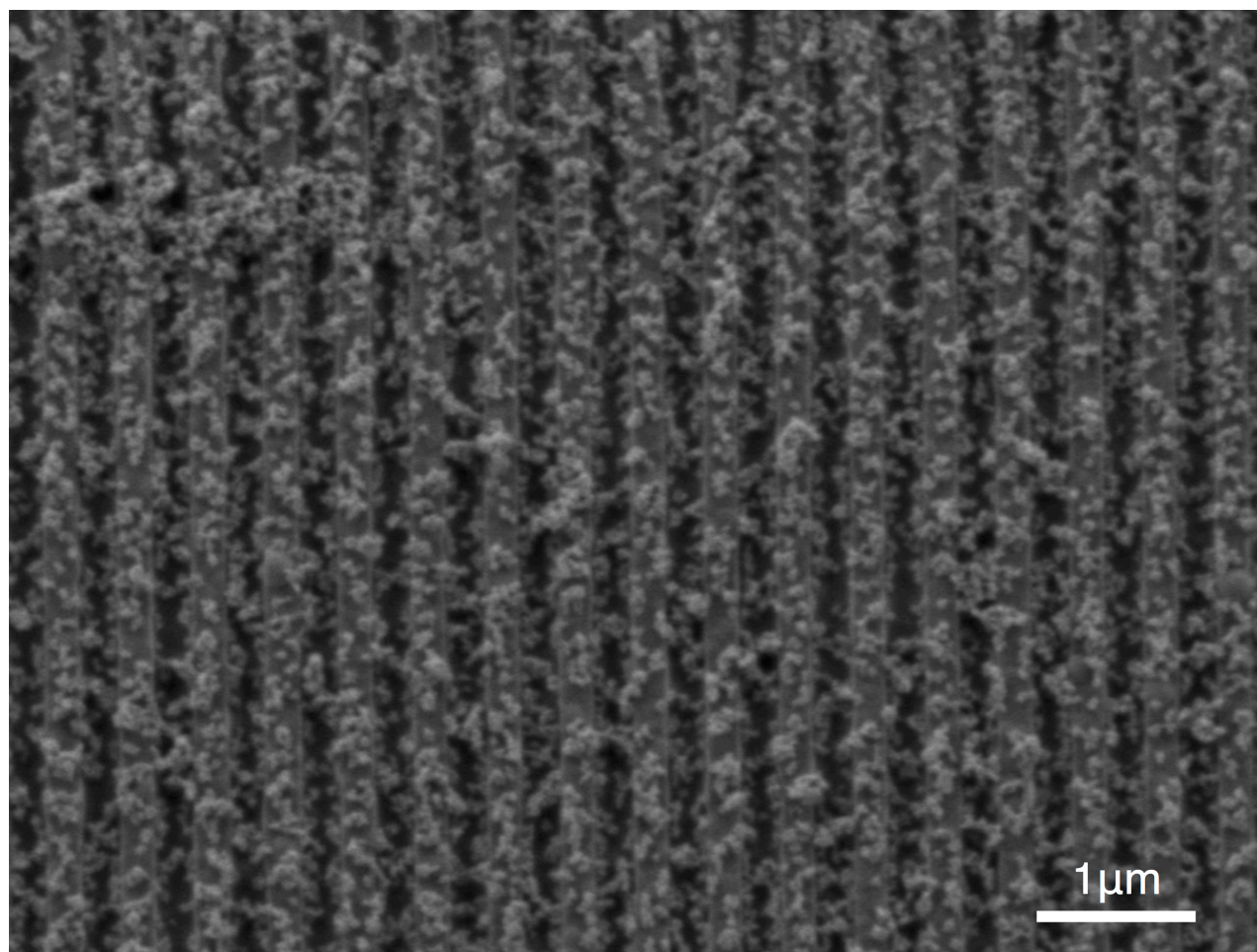


図 93 磁性粒子の固定化後のセンサ表面の電子顕微鏡観察像

7.5.2. 磁性粒子を用いたストレプトアビジンの高感度検出

図 94 は磁性粒子の有無による反射波長シフト量の変化を示す。磁性粒子を用いた高感度検出の実験を行った結果、磁性粒子を用いた場合の反射波長シフト量は 1.41 nm (Stdev = 0.16 nm, N = 3) であり、アビジン単体の場合の時の 0.35 nm (Stdev = 0.16 nm, N = 3) の結果に比べて約 4 倍に相当する反射波長シフト量が得られた。

図 95 は共鳴波長のピーク波長付近のスペクトルを示す。図 95 で示されているように、磁性粒子を用いた場合、明確に反射波長シフトが増加していることが確認できる。これらの実験結果より、磁性粒子を用いた検出感度の増幅が可能であるという結果が得られた。しかし、反射波長シフト量そのものに着目すると、前項までに取り組んできた化学結合を用いた際と同等の実験条件(磁性粒子濃度、反応時間)であったにも関わらず、アビジン-ビオチン結合に基づくシフト量は低い値となった。この現象について、今回行ったアビジン-ビオチン結合を用いた測定実験では、センサ表面の全てがアビジンで覆われていないことで、表面に結合する事が可能なビオチン修飾磁性粒子の数が限られた事が原因だと考えられる。これは、検出限界付近の条件のように、センサ表面上に相補的な生体分子がほとんど存在しなくても、極微量の標的物質が存在すれば磁性粒子が標的物質に付着して表面の屈折率が上昇することを意味する。従って、本手法を適用したセンサのダイナミックレンジの拡大が可能であると考えられる。

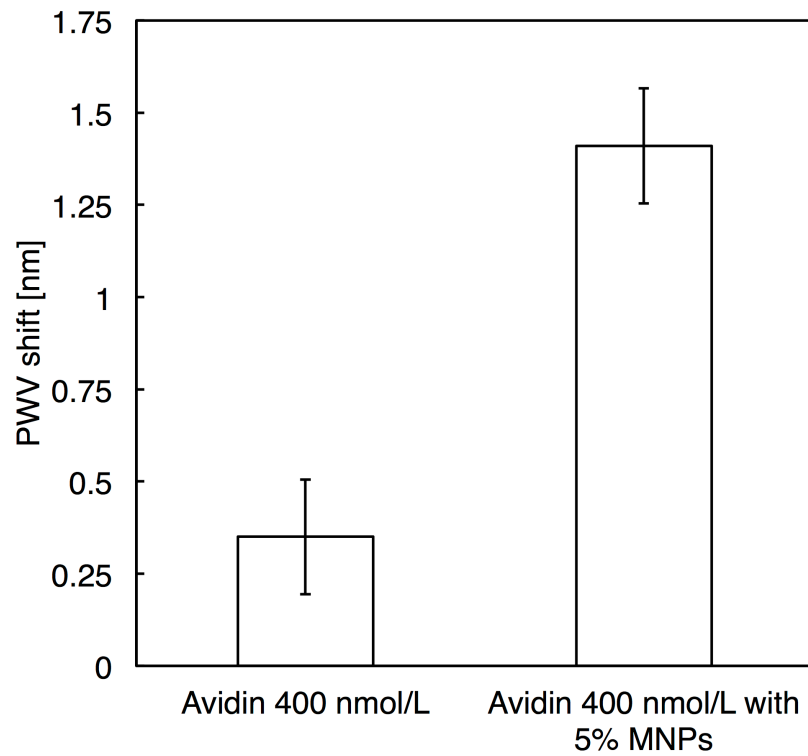


図 94 磁性粒子の有無による反射波長シフト量の変化.

(エラーバーは標準偏差を示す, N = 3)

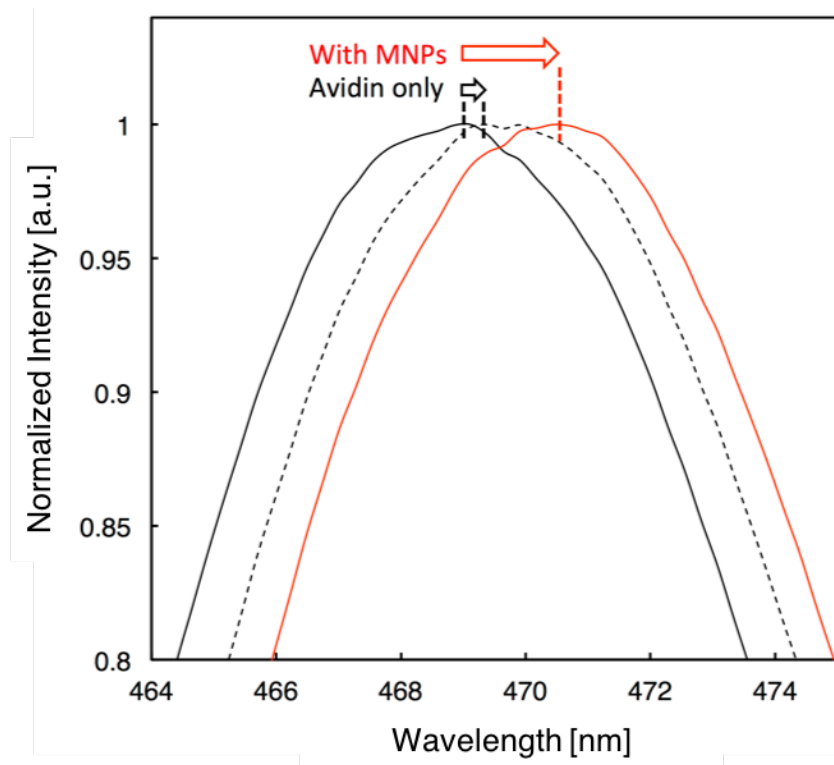


図 95 ピーク波長付近の反射スペクトルの変化の様子

7.6. サマリー

本章では、磁性粒子を用いた高感度検出手法について提案し実際にアビジン-ビオチン結合を用いた実証実験を行った。

予備実験では、化学結合を用いて磁性粒子の濃度、時間応答性に関する測定実験を行った。アビジン-ビオチン結合を用いた実証実験の結果、磁性粒子を用いて反射波長量を増大させることが可能であり高感度検出手法として用いることが可能であるという結果が得られた。

本手法においてセンサ表面上に検出限界付近の極微量の標的物質が存在するだけでも、その標的を介して磁性粒子は固定される。固定化された磁性粒子によって表面屈折率は増幅されるため、上記の手法はダイナミックレンジの向上にも用いる事が可能であるという示唆も得られた。本手法に限らず、バイオセンシングを行うにあたり、(1)標的物質が溶液中に存在していてもセンサ近傍のごく一部の標的物質しか検出することができない、(2)同一のセンサを使用しているのにも関わらず再現性が優れない等の問題が生じている。これは、生体物質のように大きさが数 nm～数十 nm 程度の物質は、液中において重力によって沈降する力に比べて熱運動による拡散が圧倒的に大きくなることに起因する。そのため、溶液中に分散している生体物質の高効率捕獲および捕獲物質の外部操作を実現することで、高感度化のみならず高精度かつ超高速なバイオセンシング手法を実現できると考えられる。

7.7. 参考文献

- [1] S. S. Wang and R. Magnusson, “Theory and applications of guided-mode resonance filters,” *Appl. Opt.*, vol. 32, pp. 2606–2613, May (1993).
- [2] R. Yukino, P. K. Sahoo, J. Sharma, T. Takamura, J. Joseph, and A. Sandhu, “Wide wavelength range tunable one-dimensional silicon nitride nano-grating guided mode resonance filter based on azimuthal rotation,” *AIP Adv.*, vol. 7, pp. 015313-1–015313-6, Jan. (2017).
- [3] M. J. Uddin and R. Magnusson, “Highly efficient color filter array using resonant Si₃N₄ gratings,” *Opt. Exp.*, vol. 21, no. 10, pp. 12495–12506, May (2013).
- [4] M. J. Uddin and R. Magnusson, “Efficient guided-mode-resonant tunable color filters,” *IEEE Photon. Technol. Lett.*, vol. 24, no. 17, pp. 1552–1554, Sep. 1, (2012).
- [5] M. J. Uddin, T. Khaleque, and R. Magnusson, “Guided-mode resonant polarization-controlled tunable color filters,” *Opt. Exp.*, vol. 22, no. 10, pp. 12307–12315, May (2014).
- [6] Q. Chen, X. Hu, L. Wen, Y. Yu, and D. R. S. Cumming, “Nanophotonic image sensors,” *Small*, vol. 12, no. 36, pp. 4922–4935, Sep. (2016).
- [7] N. Skivesen, A. Tétu, M. Kristensen, J. Kjems, L. H. Frandsen, and P. I. Borel, “Photonic-crystal waveguide biosensor,” *Opt. Exp.*, vol. 15, no. 6, pp. 3169–3176, (2007).
- [8] T. Cunningham et al., “Label-free assays on the BIND system,” *J. Biomolecular Screening*, vol. 9, no. 6, pp. 481–490, Sep. (2004).
- [9] H. Shafiee et al., “Nanostructured optical photonic crystal biosensor for HIV viral load measurement,” *Sci. Rep.*, vol. 4, no. 4116, Feb. (2014).
- [10] Q. Wang et al., “Sensitivity of a label-free guided-mode resonant optical biosensor with different modes,” *Sensors*, vol. 12, no. 7, pp. 9791–9799, Jul. (2012).
- [11] X. Zhang, X. Ma, F. Dou, P. Zhao, and H. Liu, “A biosensor based on metallic photonic crystals for the detection of specific bioreactions,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 21, no. 22, pp. 4219–4227, Sep. (2011).

- [12] R. Magnusson, D. Wawro, S. Zimmerman, and Y. Ding, "Resonant photonic biosensors with polarization-based multiparametric discrimination in each channel," *Sensors*, vol. 11, no. 12, pp. 1476–1488, Jan. (2011).
- [13] S. Zlatanovic et al., "Photonic crystal microcavity sensor for ultracompact monitoring of reaction kinetics and protein concentration," *Sens. Actuators B, Chem.*, vol. 141, no. 1, pp. 13–19, Aug. (2009).
- [14] D. Block, N. Ganesh, M. Lu, and B. T. Cunningham, "A sensitivity model for predicting photonic crystal biosensor performance," *IEEE Sensors J.*, vol. 8, no. 3, pp. 274–280, Mar. (2008).
- [15] D. Block, L. L. Chan, and B. T. Cunningham, "Photonic crystal optical biosensor incorporating structured low-index porous dielectric," *Sens. Actuators B, Chem.*, vol. 120, no. 1, pp. 187–193, Dec. (2006).
- [16] V. Canalejas-Tejero, A. López, R. Casquel, M. Holgado, and C. A. Barrios, "Sensitive metal layer-assisted guided-mode resonance SU8 nanopillar array for label-free optical biosensing," *Sens. Actuators B, Chem.*, vol. 226, pp. 204–210, Apr. (2016).
- [17] A. Sandhu, H. Handa, and M. Abe, "Synthesis and applications of magnetic nanoparticles for biorecognition and point of care medical diagnostics," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 44, p. 442001, Oct. (2010).
- [18] J. Sharma et al., "Fast and sensitive medical diagnostic protocol based on integrating circular current lines for magnetic washing and optical detection of fluorescent magnetic nanobeads," *Sens. Bio-Sens. Res.*, vol. 9, pp. 7–12, Jul. 2016.
- [19] J. C. Rife et al., *Sens. Actuators A* 107, 209, (2003).
- [20] Ivnitski et al., *Biosens. Bioelectron.* 14, 599, (1999).

8. 結論

8.1. 結論

本論文では救急医療における POCT の実現に向けて、携帯型の装置での分析を前提とした検体の定量検出手法について報告した。POCT の分野は年々拡大しており、妊娠検査薬や HIV 自己診断キットのように 0 か 1 かを判断する分析手法については普及している一方で、小型・高速・高感度で定量分析を行う手法については課題が数多く存在しておりその実現が望まれている。本研究では、画面表示機能や通信機能、高度なイメージセンサを標準的に搭載されているスマートフォンを POCT に用いることに焦点を当てた。その上で、(1)検出用の蛍光標識を必要としない光学式ラベルフリーバイオセンサおよび(2)磁性粒子を用いた高速・高効率検出手法に着目した。上記で提案した全ての要素を統合する事によって、従来まで抱えていた救急医療における POCT の課題に対して、本手法が 1 つの解決手法となることを示した。

第 1 章では本研究で取り組む内容の背景および目的について述べた。

第 2 章ではウイルスや病原菌、特定など特定の物質を検出するために必要となる抗体抗原反応やタンパク質の相互作用について述べた。加えて、医療診断技術を行ううえで欠かせない要素であるバイオセンサの原理について述べた。

第 3 章では本研究でセンシング原理として着目した導波モード共鳴効果について歴史概観からその応用事例まで述べた。

第 4 章ではスマートフォン上で検出することを前提とした GMR フィルタの設計および可変波長フィルタとしての諸特性について理論・実験の双方から述べた。

第 5 章では、作製した GMR フィルタを用いたバイオセンシング手法・生体物質の検出についてそれぞれ述べた。

第 6 章では本研究の目的でもある携帯型の機器利用を前提とした検出手法について述べた。実際にスマートフォンを用いた携帯型医療診断システムを構築するとともにスマートフォン上で生体物質の定量検出が可能である事を示した。

第 7 章では GMR フィルタの高感度化、すなわち検出限界を改善する手法を提案した。ここでは磁性粒子を用いることで特殊な設計や再加工を必要としない新たなセンシング手法を示した。

8.2. 今後の課題と展望

8.2.1. 今後の課題

現状、提案した手法では単一の素子で検出できる対象は1種類に限定される．現実的には、複合的な視点から状態を判断することが望ましい．そのため、ベースとなる基板表面上にアレイ状にフィルタを配置するなどの工夫をする必要がある．この時、本研究で提案した分光分析プラットフォームについて、複スポットからの信号光を同時に検出するための光学系を組むことが望まれる．その一方で、上記で提案する課題が解決されることでバイオセンシングのみならず水質調査のような環境モニタリングやドラッグ検査などの幅広い領域における利活用が見込めると予想される．

現実的な課題として、センサ素子の作製にコスト・時間を要するという課題も有している．本研究で提案した素子は、スマートフォン上のイメージセンサで信号を検出できるように設計している事に特徴を有している．上記の設計を実現するために、素子表面上にパターンニングを行う際のラインアンドスペースは **250 nm** とサブミクロンオーダーが要求される．そのため、汎用的な大量生産手法である光リソグラフィーを用いたパターンニングは光学限界の兼ね合いにより使用することができない．この現状に対しては、ナノインプリンティングや多光束干渉露光を用いることで解決できると考えられる．

実際のハンドリングを検討すると、現状のシステムでは人の手によるサンプル滴下・洗浄の工程は必須であるため、研究室の外の環境下での利用は現実的には制限される．そのため、サンプル滴下・洗浄の工程までを自動的に行うために流路一体型の自動測定システムを構築することが望ましい．学術・研究分野の1つの領域として“**Lab on a chip**”と呼ばれる概念が存在しており、素子そのものにサンプル導入・洗浄を行うための流路やポンプ機構を組み込む手法は種々提案されている．これらの手法を本システムに導入する事で画一的な測定を実現することが可能となる．

8.2.2. 将来の展望

本研究における将来的な展望や展開について以下に述べる．本研究の展望として **AI(Artificial Intelligence)を用いた次世代型診断プラットフォームの構築**が挙げられる．

近年、イメージセンサの感度や画素数の飛躍的な向上に加えてクラウド上に構築したサーバー上での集中処理、マシンの処理性能・速度そのものの向上などの主要技術が発展してきている．その中でも、特にイメージセンサと人工知能技術(主に機械学習)を組み合わせた物体認識技術については既に世の中への普及まで進んできており、イメージセンサから得られた特徴量から対象物を推定する技術が確立されてきている．

ここで、本研究の検出・測定原理について改めて着目すると、GMR フィルタから得られる反応の前後における信号光をスマートフォン上のイメージセンサで読み取り強度分布を解析することで標的物質を検出している．既存の GMR フィルタを用いたバイオセンシングの検出・測定原理においても、イメージセンサから得られた画像データについて最大輝度となる場所(ディテクタ上のピクセルの位置)がどの様に変化したかを測定しているのみである．これに対して、既知の試料を GMR フィルタ上に反応させて、イメージセンサから得られる画像情報を学習させることで AI による予測モデルが作成出来ると着想した．

実際に実験を行う上で、高精度な予測モデルを作成するためには学習データを大量に用意する必要がある．しかし、現代のスマートフォンに着目すると 4K/24fps で動画を撮影することが可能である．そのため、わずか 1 分間の動画撮影で 1440 枚にも及ぶ大量の学習データを取得できる．

上記のアイディアの有用性を検証するために、AI に基づく未知試料の推定を行った．モデルの作成には CNN (Convolutional Neural Network) を用いた．純水および 5, 10, 15, 20, 25%に調整した NaCl 溶液を学習用の試料として用意する．学習モデルの作成のために、それぞれの溶液を GMR フィルタ上に滴下した時に得られる信号をスマートフォン(iPhone 8 Plus)上で 2 分間にわたり動画で撮影・記録した．この時、それぞれの濃度に対して 2880 枚に相当する学習用のデータが得られる．これらのデータから予測モデルを算出した(図 96)．学習モデルを作成した後に、本実験における AI の実証実験として試料を滴下した際に、正確に測定試料の NaCl 濃度を推定できるかどうかを検証した(図 97)．今回の実験では、未知試料として 10%と 15%の NaCl 溶液を 1:1で混合した NaCl 溶液を用いた．

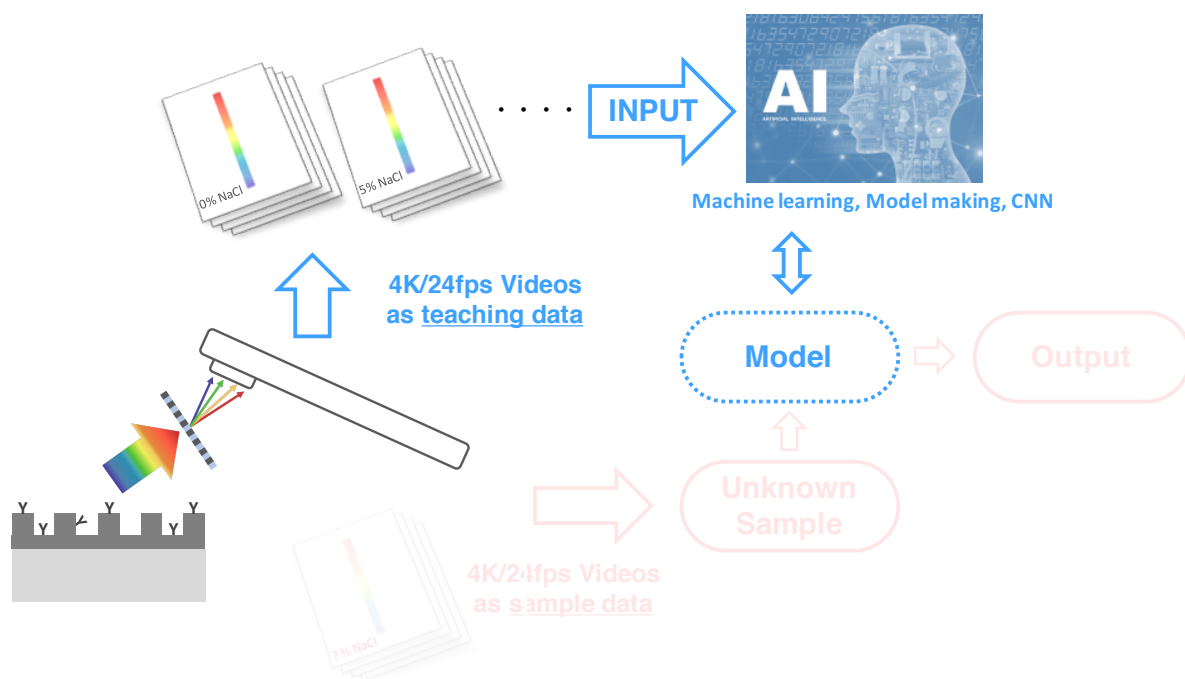


図 96 スマートフォンと AI を用いた推定モデルの作成

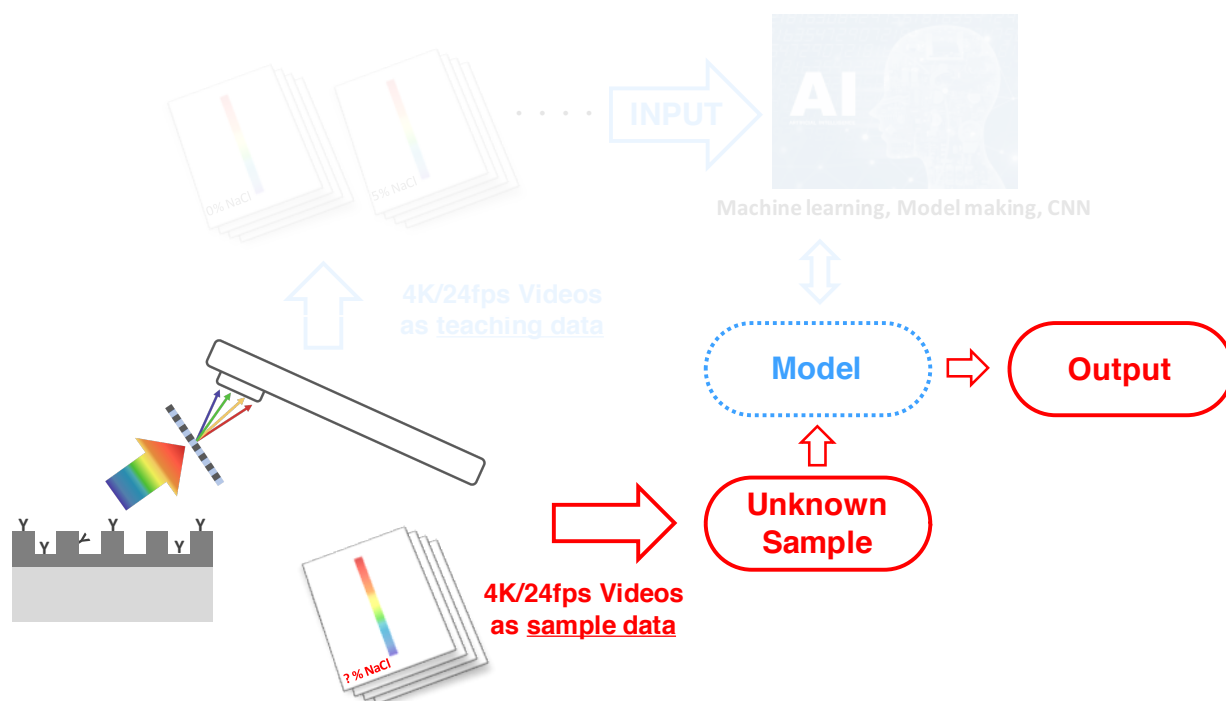


図 97 作成したモデルを用いた未知試料の推定

実験の結果、AI が作成したモデルにより推定された値は 13.4%という結果が得られた。数値計算上における理論上の値である 12.5%に対して 1%以内の誤差を示した。各 NaCl 溶液の計量時やハンドリングにおける誤差を考慮すると 13.4%という値について妥当性があると考えられる。上記の例では屈折率濃度を予測したが、GMR フィルタ表面上に抗体固定化や表面化学処理を行うことで、ウイルスや抗原、化学物質など特定の標的物質を検出するためのモデルも作成することが可能となる。

AI と GMR フィルタを掛け合わせたセンシング手法の実現可能性は非常に高く、本研究領域における新たな研究開発指針の一つになると確信している。実際にスマートフォンから得られたデータをクラウド上に設置された解析システムに送るだけで解析結果が得られる。そのため、(1)持ち運びが可能にもかかわらず(2)どこでもその場で(3)高感度に定量分析を行えるシステムが実現される。図 98 に示すように、本研究で取り上げた医療診断技術以外にも農作物の成分分析や環境のモニタリングなど多岐に渡る領域において提案する仕組みが活用されることが期待できる。

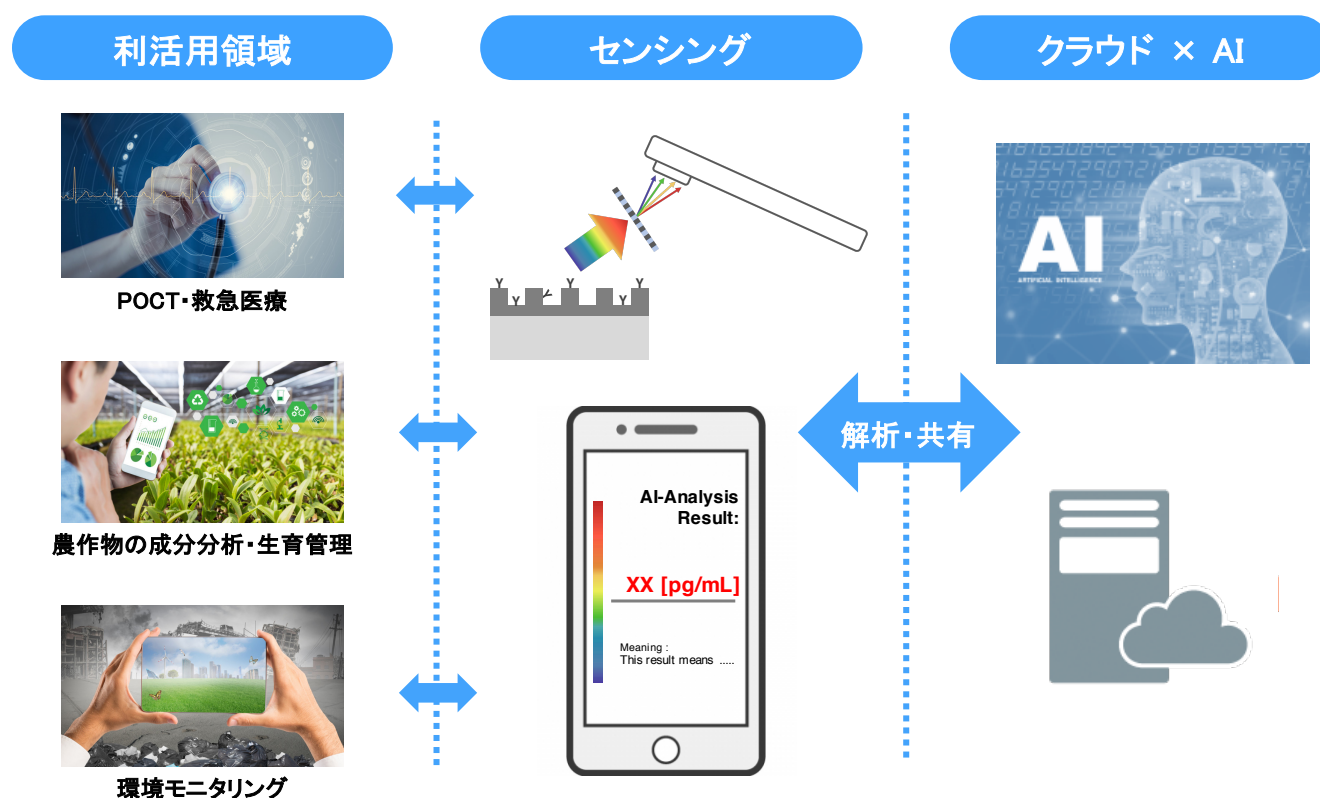


図 98 AI×クラウドサービス×GMR フィルタの活用領域

謝辞

本論文は、筆者が電気通信大学在学中に Sandhu 研究室において行った研究をまとめたものです。

本論文を結ぶにあたり、学部 4 年から博士前期・後期課程において指導していただきました電気通信大学 Adarsh SANDHU 教授に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、第 3 章で述べた GMR フィルタの作製や構造評価にはインド工科大学 Joby Joseph 教授、Pankaj Kumar Sahoo 氏には数多くのご助言、ご指導を頂きました。心より感謝しております。

Sandhu 研究室の大先輩でもある Ko Pil Ju 氏、高村司氏には実験や研究の基礎を優しく教えていただいただけでなく、公私ともに大変お世話になりました。

私が Sandhu 研究室に配属されるまで、研究室の歴史を積み上げてきてくださった Sandhu 研究室卒業一同に心から感謝いたします。卒業したメンバー各々が築き上げた礎のおかげで私は豊かな研究生活を過ごすことができたと確信しております。同期の Jaiyam Sharma 氏にはともに博士後期課程を歩む仲間として日々、議論を交わし互いを切磋琢磨しあえた事、とても感謝しています。学部・修士の学生一同はともに本学での研究室一期生としてともに立ち上げの時期を共有できた事は楽しい思い出でした。短い期間ではありましたが、共に学び議論を交わしたインド工科大学 PHOTONICS Research Lab のメンバーにはインドでの研究生活を様々な側面からサポートしていただいたことで、とても有意義な研究生活を過ごせました。

本学で右も左もわからない状態から、実験設備の共有や相談にいつも快く協力して下さった基盤理工学専攻の先生方や博士課程の学生諸氏にとっても感謝しています。

最後に博士課程への進学を心から応援してくれた家族に心より深謝いたします。

2019 年 3 月

雪野 瞭治

業績リスト

(1) 学術雑誌等に発表した論文, 著書 (全て査読あり)

主著 (関連論文の印刷公表の方法及び時期)

1. R. Yukino, J. Sharma, T. Takamura, J. Joseph, and A. Sandhu, “Magnetic nanoparticle-based nano-grating guided-mode resonance biosensors,” *IEEE Transactions on Magnetics*, 54, no. 2 pp. 1-6, (2017).

※第 5, 第 7 章で述べた内容に相当する

2. R. Yukino, P. K. Sahoo, J. Sharma, T. Takamura, J. Joseph, and A. Sandhu, “Wide wavelength range tunable one-dimensional silicon nitride nano-grating guided mode resonance filter based on azimuthal rotation,” *AIP Advances*, 7, pp. 015313-1-015313-6, (2017).

※第 4 章で述べた内容に相当する

参考論文

1. J. Sharma, S. Ishizawa, R. Yukino, T. Takamura, N. Hanyu, H. Yasuno, H. Handa, and A. Sandhu, “Fast and sensitive medical diagnostic protocol based on integrating circular current lines for magnetic washing and optical detection of fluorescent magnetic nanobeads,” *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9, pp. 7–12, (2016).
2. P. K. Sahoo, J. Joseph, R. Yukino, A. Sandhu, “High sensitivity refractive index sensor based on simple diffraction from phase grating,” *Optics Letters*, 41, pp. 2101-2104, (2016).
3. T. Takamura, P. Ko, J. Sharma, R. Yukino, S. Ishizawa, and A. Sandhu, “Magnetic-Particle-Sensing Based Diagnostic Protocols and Applications,” *Sensors*, 15, pp.12983–12998, (2015).

(2) 国際学会発表

- 1) R. Yukino, K. Ambai, J. Sharma, and A. Sandhu, “Enhancement of sensitivity of nano-grating guided mode resonance filter by varying azimuthal rotation,” The Irago Conference 2018, 1 November, 2018, Tokyo, Japan.
- 2) J. Sharma, R. Yukino, and A. Sandhu , “Simultaneous tracking of thousands of microbeads with a smartphone for biosensing applications,” The Irago Conference 2018, 1 November, 2018, Tokyo, Japan.
- 3) T. Ono, R. Yukino, J. Sharma, and A. Sandhu , “Rapid and highly sensitive medical diagnostic protocol using fluorescent magnetic particles ,” The Irago Conference 2018, 1 November, 2018, Tokyo, Japan.
- 4) H. Miyashita, J. Sharma, R. Yukino, and A. Sandhu, “Observation of single fluorescent magnetic nanoparticles on gold surfaces,” The Irago Conference 2018, 1 November, 2018, Tokyo, Japan.
- 5) K. Ambai, R. Yukino, J. Sharma, and A. Sandhu, “Quantitative detection of biomolecules with photonic crystals ,” The Irago Conference 2018, 1 November, 2018, Tokyo, Japan.
- 6) A. Abderrahmane, R. Yukino, K. Ambai, H. Tokuhara, H. Zhang, Y. Okamura, H. Kimura, R. Kita, and A. Sandhu, “Fabrication and magnetic control of polymer based soft nanorobot,” The Irago Conference 2017, 1-2 November, 2017, Tokyo, Japan.
- 7) J. Sharma, R. Yukino, T. Takamura, and A. Sandhu, “Fabrication and magnetic control of polymer based soft nanorobot,” The Irago Conference 2017, 1-2 November, 2017, Tokyo, Japan.
- 8) R. Yukino, P. K. Sahoo, J. Sharma, T. Takamura, J. Joseph, and A. Sandhu, “Tunable color filter using guided mode resonance structures,” The Irago Conference 2017, 1-2 November, 2017, Tokyo, Japan.
- 9) R. Yukino, P. K. Sahoo, J. Sharma, T. Takamura, J. Joseph, and A. Sandhu, “Magnetic nanoparticle-based nano-grating guided-mode resonance biosensors,” The Irago Conference 2017, 1-2 November, 2017, Tokyo, Japan.
- 10) P. K. Sahoo, J. Sharma, R. Yukino, A. Sandhu, and J. Joseph, “Tuning of Guided Mode Resonance wavelength by azimuthal rotation,” The Irago Conference 2017, 1-2 November, 2017, Tokyo, Japan.

- 11) R. Yukino, J. Sharma, T. Takamura, J. Joseph, and A. Sandhu, "Magnetic nanoparticle-based nano-grating guided-mode resonance biosensors," INTERMAG 2017, 24-28 April, 2017, Dublin, Ireland.
- 12) R. Yukino, J. Sharma, T. Takamura, J. Joseph, and A. Sandhu, "Smartphone-based Platform for Medical Diagnostics ," The Irigo Conference 2016, 1-2 November, 2016, Tokyo, Japan.
- 13) R. Yukino, P. K. Sahoo, J. Sharma, T. Takamura, J. Joseph, and A. Sandhu, "Tunable color filter using guided mode resonance structures," *The Irigo Conference 2016*, 1-2 November, 2016, Tokyo, Japan.
- 14) T. Takamura, R. Yukino, H. Tahara, A. Abderrahmane and A. Sandhu, "Novel capsule for nanoscale observation of materials in liquid by transmission electron microscopy," *The Irigo Conference 2016*, 1-2 November, 2016, Tokyo, Japan.
- 15) J. Sharma, R. Yukino, T. Takamura, and A. Sandhu, "Biosensing by digital image processing based detection of fluorescent magnetic nanolabels and micro-current coils for reduction of non-specific interactions," *The Irigo Conference 2016*, 1-2 November, 2016, Tokyo, Japan.
- 16) A. Abderrahmane, H. Miyashita, R. Yukino, T. Takamura, and A. Sandhu, "Magnetic control of self-assembled superparamagnetic micro-particles for microrobotic applications ," *The Irigo Conference 2016*, 1-2 November, 2016, Tokyo, Japan.
- 17) J. Sharma, R. Yukino, T. Takamura, A. Sandhu, "Design of an innovative smartphone based spectrometer for medical diagnostics," *The Irigo Conference 2015*, 22-23 October, 2015, Irigo, Tahara city, Japan.
- 18) R. Yukino, J. Sharma, T. Takamura, J. Joseph, and A. Sandhu, "Smartphone-based Platform for Medical Diagnostics ," *The Irigo Conference 2015*, 22-23 October, 2015, Irigo, Tahara city, Japan.
- 19) R. Yukino, T. Tashiro, T. Takamura, and A. Sandhu, "Development of iPhone Microscope," *The Irigo Conference 2013*, 24-25 October, 2013, Irigo, Tahara city, Japan.
- 20) J. Sharma, R. Yukino, H. Takahashi, J. Joseph, A. Sandhu, "Design and operation of an iPhone based spectrometer produced by 3D printing for medical diagnostics," *The Irigo Conference 2013*, 24-25 October, 2013, Irigo, Tahara city, Japan.

- 21) T. Tashiro, P.J. Ko, R. Yukino, A. Arakaki, and A. Sandhu, “Dynamics of Magnetotactic Bacteria Under Rotating Magnetic Fields,” *The Irago Conference 2013*, 24-25 October, 2013, Irago, Tahara city, Japan.
- 22) H. Takahashi, P. J. Ko, T. Takamura, R. Yukino, J. Joseph, and A. Sandhu, “Electron-beam lithography for fabricating photonic crystals for optical biosensing,” *The Irago Conference 2013*, 24-25 October, 2013, Irago, Tahara city, Japan.

(3) 国内学会・シンポジウム等における発表

- 1) 雪野 瞭治, シャルマ ジャイヤム, 高村 司, ジョセフ ジョビー, サンドゥー アダルシュ, “スマートフォン系医療診断用分光分析プラットフォーム,” 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 第76回応用物理学会秋季学術講演会講演予稿集 pp. 03-422 (16a-1E-11), 2015年9月13日-16日, 名古屋市, 名古屋国際会議場.
- 2) J. Sharma, R. Yukino, T. Takamura, J. Joseph, A. Sandhu, “Design of an innovative smartphone based spectrometer for medical diagnostics,” 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 第76回応用物理学会秋季学術講演会講演予稿集 pp.03-273 (14p-2N-10), 2015年9月13日-16日, 名古屋市, 名古屋国際会議場.
- 3) 雪野 瞭治, 高村 司, 高 必周, サンドゥー アダルシュ, “iPhone を用いた分光測定システムの開発,” 電子情報通信学会 電子デバイス研究会, 2014年7月10日-11日, 豊橋市, 豊橋技術科学大学 VBL.
- 4) 田原 知行, 高村 司, 雪野 瞭治, 石澤 峻路, サンドゥー アダルシュ, “透過型電子顕微鏡による液中試料観察用カプセルに関する研究,” 電子情報通信学会 電子デバイス研究会, 2014年7月10日-11日, 豊橋市, 豊橋技術科学大学 VBL.

(4) 特許等

1) 「磁性粒子を用いたバイオセンシング方法及び装置」

サンドウー・アダルシュ, シャルマ・ジャイヤム, 高村 司, 雪野 瞭治, 羽生 尚広, 安野 寛, 浜 信治, 田中 俊行, 半田 宏

特願 2016-026823, 出願日:2016 年 2 月 16 日

2) 「基板上の粒子の検出装置」

サンドウー・アダルシュ, シャルマ・ジャイヤム, 高村 司, 雪野 瞭治, 羽生 尚広, 安野 寛, 浜 信治, 田中 俊行

特願 2016-026818, 出願日:2016 年 2 月 16 日

3) 「波長選択フィルタ装置, 波長選択フィルタリング方法, 及びフィルタ素子のキャリブレーション方法」 サンドウー アダルシュ, 雪野 瞭治, 高村 司

特願 2016-010981, 出願日:2016 年 1 月 22 日